

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Vegetal



**Estudo do papel do gene *Rv1358* no estabelecimento e maturação dos biofilmes formados por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis***

**Dissertação  
Mestrado em Biologia Molecular e Genética**

Marta Helena Melo de Campos e Cunha Vaz

Dissertação orientada por:  
Professora Doutora Mónica Vieira Cunha

**2016**



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, Doutora Mónica Vieira Cunha, por todos os conselhos e orientação técnica, destacando ainda a sua simpatia e preocupação constante com os seus alunos.

Em seguida, não posso deixar de expressar o meu agradecimento ao Laboratório de Bacteriologia e Micologia da Unidade Estratégica de Investigação e Serviços em Produção e Saúde Animal (UEISPSA), do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV,IP), por me ter acolhido durante a realização deste trabalho.

Da mesma forma, agradeço, à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT). O trabalho presente nesta dissertação foi parcialmente financiado pela FCT, no âmbito do projecto nacional PTDC/CVT/117794/2010, com enquadramento no Projecto 3599 – Promover a Produção Científica e Desenvolvimento Tecnológico e a Constituição de Redes Temáticas.

Agradeço ainda à D. Conceição, do Serviço de Produção de Meios de Cultura da UEISPSA, pela sua disponibilidade e ajuda na preparação de meios de cultura; e aos meus colegas do grupo de investigação, Ana Reis, Ana Prata e Tiago Baeta, pelo companheirismo, nas muitas horas de trabalho e pelo bom ambiente que se criou no laboratório.

Por fim, agradeço à minha família; namorado e amigos, pelo apoio incondicional, e a todos quantos me ajudaram que, embora não estejam aqui mencionados, a eles expresso toda a minha gratidão.

A todos, um muito obrigada!

## Resumo

A tuberculose é uma doença infecciosa de etiologia bacteriana, com uma incidência anual média superior a 9 milhões de casos e tendo sido associada à morte de 1.5 milhões de indivíduos só em 2014. Dentro do género *Mycobacterium*, o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) engloba várias espécies patogénicas, fenotípica e genotipicamente relacionadas, nomeadamente *Mycobacterium tuberculosis*, o principal agente etiológico da tuberculose humana, e *M. bovis*, o agente da tuberculose bovina.

A interação entre *M. tuberculosis* e os macrófagos é um processo complexo que determina a evolução da infeção. Esta interação é influenciada por múltiplos fatores, tais como o genótipo da micobactéria, o genótipo do hospedeiro, e também por fatores ambientais. Uma vez dentro do fagossoma, e após impedir a fusão com o lisossoma, as micobactérias estabelecem-se no interior dos macrófagos, onde são capazes de sobreviver, ainda que expostas a variados stresses, nomeadamente oxidativo e nitrosativo. Os modelos atuais de persistência micobacteriana mencionam a presença de populações de células latentes que reativam mediante imunossupressão do hospedeiro. O fenótipo de latência característico da infeção causada por *M. tuberculosis*, com menor taxa de replicação intracelular, resistência a compostos antimicrobianos e proteção a agressões ambientais em resultado do enclausuramento e compartimentação das micobactérias no granuloma, apresenta semelhanças com o fenótipo exibido por células organizadas em biofilme. Os biofilmes maduros fornecem microambientes adequados ao desenvolvimento de uma subpopulação persistente de células tolerantes a stresses xenobióticos. Recentemente, foi sugerido que *M. tuberculosis* necessita de um ambiente e programa genético específicos para formar comunidades biológicas com elevado grau de organização, que possam conter células tolerantes a agentes antimicrobianos no interior de uma estrutura rica em ácidos micólicos livres. No entanto, estão ainda reunidas escassas evidências experimentais que identifiquem inequivocamente os determinantes ambientais e genéticos associados ao processo de formação de biofilme, sendo também reduzida a informação neste âmbito no que se refere a *M. bovis*. Neste trabalho, procurou-se determinar as condições ambientais que favorecem a formação de biofilmes por bactérias do complexo *M. tuberculosis*. Testou-se também a hipótese de que a limitação de oxigénio e a exposição aos stresses oxidativo e nitrosativo encontrados por micobactérias enclausuradas nos granulomas poderão desencadear uma resposta de crescimento associado a biofilme.

O processo de *quorum sensing*, resultante da acumulação de moléculas sinalizadoras que privilegiam a comunicação intra- e intercelular, envolve a regulação de genes que controlam atividades que são benéficas quando realizadas por um grupo de bactérias que atuam em sincronia, como o processo de formação de biofilmes. A análise comparativa de genomas de micobactérias sugere que o gene *Rv1358* seja um possível regulador transcricional da família LuxR, a qual inclui proteínas de outros microrganismos que se sabe estarem envolvidas na regulação da expressão génica dependente de fenómenos de densidade celular. A análise efetuada por pesquisa de homologia nas bases de dados dos domínios funcionais da proteína *Rv1358* indica que, além do domínio LuxR, existe uma região associada à atividade de adenilato ciclase, pelo que se presume que a proteína resultante exerça atividade reguladora da expressão génica em resposta a estímulos ambientais específicos. A análise comparativa, neste trabalho, de 26 genomas de *M. bovis* e 52 genomas de *M. tuberculosis*, que se encontram disponíveis nas bases de dados internacionais, demonstrou que, apesar de se detetarem algumas variações nucleotídicas e aminoácidas, a sequência desta região codificante apresenta elevado grau de conservação entre as estirpes de *M. bovis*. No entanto, nas estirpes de *M. tuberculosis* existe uma maior variação, com acumulação de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), inserções e eliminações. Estes polimorfismos são mais frequentes nos domínios de adenilato ciclase e de ATPase. No caso do domínio de adenilato ciclase, os polimorfismos estão presentes sobretudo em *M. bovis*, especulando-se que possa resultar de uma pressão evolutiva para melhorar a resposta a estímulos ambientais. A modelação da estrutura tridimensional da proteína de estirpes que apresentavam polimorfismos em domínios funcionais teve como objetivo avaliar as presumíveis consequências estruturais e funcionais dos polimorfismos identificados, verificando-se que as alterações mais frequentes provocam um rearranjo tridimensional distinto, com alteração espacial e posição distal dos domínios de ATPase e LuxR, o que sugere consequências funcionais nas interações moleculares da proteína em estudo com outras proteínas e substratos/ligandos e, consequentemente, na sua atividade biológica. A partir do alinhamento dos genomas de *M. bovis* e *M. tuberculosis* analisados, foram construídos cladogramas para avaliar a microevolução do gene *Rv1358* nestes dois ecotipos. Os resultados obtidos sugerem diferentes padrões microevolutivos deste gene nos membros do complexo *M. tuberculosis*, o que possivelmente reflete a adaptação específica do agente etiológico humano e bovino aos respetivos hospedeiros e também a adaptação biogeográfica das estirpes analisadas. Acresce ainda que, em *M. tuberculosis*, parece existir um cenário de pseudogeneização, sugerido pela acumulação de numerosas mutações no gene *Rv1358*, algumas causando disrupção dos seus domínios reguladores e destruindo o potencial de codificação de uma proteína funcional. Da

análise bioinformática realizada, constatou-se ainda a possibilidade do gene *Rv1358* ter um local alternativo de transcrição, que não a partir do promotor canónico, com local de ligação de *sigF* a meio do gene (promotor intragénico). Isto originará a transcrição de um mRNA truncado: a análise *in silico* da sequência traduzida do transcrito intragénico dependente de *sigF* indica a formação de uma proteína deficitária em cerca de 250 resíduos na extremidade N-terminal, que corresponde à eliminação do domínio de adenilato ciclase. Se existem duas formas funcionais da proteína Rv1358 é atualmente ainda desconhecido. Por outro lado, especulamos que a produção de um RNA não codificante resultante da transcrição parcial da sequência de DNA codificante (CDS) em análise possa igualmente exercer efeitos regulatórios em *trans*.

Neste trabalho, realizou-se também o crescimento em descontínuo de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, *M. bovis* BCG Tokyo, e de quatro estirpes de campo de *M. bovis* (I, II, III, IV) em meio Middlebrook 7H9 modificado, com o objetivo de se caracterizar a resposta fisiológica e transcricional destas estirpes a condições ambientais *in vitro* que mimetizam o microambiente do hospedeiro, tais como stresses oxidativo, nitrosativo e a presença de colesterol. Para determinar e comparar a resposta fisiológica das várias estirpes após exposição às condições impostas, foram determinadas as absorvâncias a 590 nm das frações celulares aderidas a superfícies e coradas com violeta de cristal; contagem do número de células viáveis; cálculo da sobrevivência; e cálculo das taxas específicas de crescimento. Para *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 e *M. bovis* BCG Tokyo, relativamente aos compostos que causam stresse oxidativo (peróxido de hidrogénio, ácido cítrico, ácido ascórbico e metil de viologénio), registaram-se diferenças extremamente significativas ( $p < 0.001$ ) na capacidade de formação de biofilmes na presença de 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 15 mM de ácido ascórbico e 150 µM de metil de viologénio, quando comparada com o controlo, acompanhada de uma diminuição drástica da sobrevivência, em mais de 50%. Na presença de 10 mM de ácido cítrico verificam-se diferenças significativas ( $p < 0.05$ ). Na presença de ácido cítrico e ácido ascórbico, observa-se preferencialmente a formação de biofilme na parte inferior, no poço, mas não em suspensão, o que contrasta com as observações na presença de outros compostos. O nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) e o nitroprussiato de sódio (NPS) foram testados por gerarem stresse nitrosativo. Na presença de uma concentração de 25 mM de NaNO<sub>2</sub>, ocorrem diferenças extremamente significativas ( $p < 0.001$ ) na formação de biofilme e a sobrevivência da população reduz para 50%. Na presença de nitroprussiato de sódio, verificam-se os valores mais elevados de biofilme registados neste trabalho, por comparação com o controlo, com diferenças extremamente significativas ( $p < 0.001$ ) em resposta a uma concentração de 25 mM de NPS. A baixa sobrevivência na presença deste composto, concomitante com um aumento da quantidade de células aderidas, sugere

que o stresse gerado possa favorecer uma resposta de crescimento em biofilme. Na presença de colesterol, não existem diferenças significativas entre o controlo (com Tween80®) e a condição em teste, nas várias estirpes estudadas. Também foi estudada a influência de cloreto de sódio na formação de biofilmes, verificando-se que, na presença de 3% de NaCl, ocorrem diferenças extremamente significativas ( $p < 0.001$ ), com uma menor formação de biofilme na presença de stresse salino e com valores de sobrevivência inferiores a 20%.

Nas estirpes virulentas de *M. bovis*, a presença de 9 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou de 25 mM de NaNO<sub>2</sub> causa também uma diminuição do biofilme formado, com diferenças extremamente significativas ( $p < 0.001$ ). Também nas estirpes *M. bovis* I e II, o composto NPS é o único em cuja presença se verificam valores mais elevados de biofilme, apresentando diferenças extremamente significativas ( $p < 0.001$ ) relativamente ao controlo. Na presença de colesterol, não se registam diferenças significativas.

O perfil transcricional do gene *Rv1358* e *sigF* nas condições de stresse estabelecidas, estudadas nas duas estirpes de campo de *M. bovis* (I e II) apresentou diferenças, sugerindo respostas transcricionais individuais, com um perfil estirpe-dependente, aos estímulos ambientais estudados. Verifica-se a sub-expressão dos genes *Rv1358* e *sigF* em quase todas as condições ambientais de stresse estudadas. Destaca-se em particular o efeito exercido pelo ácido ascórbico que induz um comportamento celular e transcricional distinto, dependendo da estirpe estudada: a expressão transcricional relativa de *Rv1358* e de *sigF* encontra-se aumentada nove e oito vezes, respetivamente, em *M. bovis* I, mas diminuída em *M. bovis* II.

A construção de um mutante de eliminação por uma estratégia de transdução especializada para se estudar o papel do gene *Rv1358* na fisiologia micobacteriana foi delineada e avançada, tendo-se obtido a construção de um fagemídeo com as regiões a montante e jusante de *Rv1358* clonadas. Após construção do mutante, a ser concluída no futuro, será efetuada uma análise funcional e fenotípica do mesmo, por comparação com os resultados obtidos com a estirpe selvagem, dando-se assim um contributo para a análise funcional de genes do complexo *M. tuberculosis* e, particularmente, para aferir a importância deste gene na resposta a stresses ambientais característicos do hospedeiro. Por fim, a confirmar-se, no futuro, que *Rv1358* sofreu um processo de pseudogenização em *M. tuberculosis*, deverá ser explorada a sua transcrição ativa em diferentes condições fisiológicas e a possibilidade do transcrito exercer um efeito regulatório, nomeadamente sobre o seu gene parental.

Palavras-chave: *Mycobacterium bovis*, tuberculose, biofilmes, stresse oxidativo e nitrosativo, *Rv1358*

### **Abstract (Resumo em inglês)**

Tuberculosis is an infectious disease of bacterial etiology, with an average annual incidence of over 9 million cases, and to the death of 1.5 million people in 2014 alone. Within the genus *Mycobacterium*, the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) comprises several phenotypically and genotypically related pathogenic species, including *Mycobacterium tuberculosis*, the main etiological agent of human tuberculosis, and *M. bovis*, the agent of bovine tuberculosis.

The interaction between *M. tuberculosis* and macrophages is a complex process that determines the progression of the infection. This interaction is influenced by multiple factors, including the bacterium genotype, the genotype of the host, as well as by environmental factors. Once inside the phagosome, and after preventing its fusion with the lysosome, mycobacteria settle within macrophages, being able to survive even if exposed to different stress conditions, such as oxidative and nitrosative stress. Current models of persistent mycobacterial infection suggest the existence of latent cell populations that have the ability to reactivate upon immunosuppression of the host. Asymptomatic latency and persistence, associated to a dormant and non-replicating state of infecting microorganisms displaying antibiotic resistance, is a hallmark of *M. tuberculosis* infections in humans that has similarities to the phenotype exhibited by microbial biofilms. Mature biofilms provide microenvironments that are suitable for the development of a persistent subpopulation of xenobiotic-tolerant cells. Recently, it has been suggested that *M. tuberculosis* requires a specific environment and genetic program to form biological communities exhibiting a high degree of organization, which may contain antimicrobial-tolerant cells within a structure rich in free mycolic acids. However, there are still scarce experimental evidences regarding the unambiguous identification of the genetic and environmental determinants associated with biofilm formation, which holds particularly true in the case of *M. bovis* for which little information is currently available. In this work, we tried to determine which environmental conditions favor biofilm formation by *M. tuberculosis* complex bacteria. In addition, we also tested the hypothesis that oxygen limitation and exposure of granuloma-enclosed mycobacteria to nitrosative and oxidative stress may elicit a biofilm growth response.

Quorum sensing is an intra- and intercellular communication process, resulting from the accumulation of signaling molecules that interfere with the regulation of genes controlling activities that are beneficial when carried out by a group of bacteria acting in synchrony, such as the process of biofilm formation. The comparative analysis of mycobacterial genomes suggests that *Rv1358* gene is a possible



transcriptional regulator of the LuxR family, which includes proteins from other microorganisms that are known to be involved in cell density-dependent regulation of gene expression. The analysis of the functional domains of *Rv1358* protein, performed through homology searches in online databases, indicates adenylate cyclase activity in addition to the LuxR domain, which together suggest that this protein may regulate gene expression in response to specific environmental stimuli. The comparative analyses, performed in this study, of 26 *M. bovis* and 52 *M. tuberculosis* genomes that are available in international databases, and using *M. tuberculosis* H37Rv genome as reference, shows that, even though some nucleotide and aminoacid variation is found, this coding DNA sequence (CDS) exhibits a high degree of conservation across *M. bovis* strains. However, *M. tuberculosis* strains exhibit marked variations, accumulating single nucleotide polymorphisms (SNPs), insertions and deletions in this CDS. The majority of these polymorphisms are present in the cyclase and ATPase domains. In the particular case of the adenylate cyclase domain, the polymorphisms are present mainly in *M. bovis*, which might be a result of evolutionary pressure to improve the response to environmental stimuli. Modeling of the three dimensional structure of the protein from strains that exhibited polymorphisms in functional domains was carried out to evaluate their potential structural and functional consequences. The most frequent changes detected originated a distinct three-dimensional rearrangement, with changes in spatial and distal positions of LuxR and ATPase domains, suggesting functional consequences on the molecular interactions of this protein with other substrates/ligands and hence on its whole biological activity. Cladograms were inferred from the alignments of the genomes of *M. bovis* and *M. tuberculosis*, in order to evaluate the microevolution of the *Rv1358* gene in these two ecotypes. The results suggest the existence of different micro-evolutionary patterns of this gene in *M. tuberculosis* complex members, which possibly reflects specific adaptation of human and cattle bacilli to their respective hosts, as well as the biogeographical adaptation of analyzed strains. Furthermore, in *M. tuberculosis*, the existence of a pattern of pseudogenization is suggested by the accumulation of numerous mutations in *Rv1358*, some leading to the disruption of its regulatory domains and destroying its potential to encode a functional protein. Our bioinformatic analysis also suggests an alternative transcription site, other than the canonical promoter, evidenced by the presence of a consensus sequence for *sigF* alternative sigma factor in the middle of *Rv1358* (intragenic promoter). Transcription from this alternative site is expected to originate a truncated mRNA: the *in silico* analysis of the translated sequence of the *sigF*-dependent, intragenic transcript, predicts the formation of an incomplete protein, lacking approximately 250 residues at the N-terminus, which corresponds to the elimination of the adenylate cyclase domain. If there are two functional forms of *Rv1358* protein is

currently unknown. Moreover, we hypothesize that the production of a non-coding RNA transcript resulting from the partial CDS in question may also exert *trans*-acting regulatory effects.

In this work, batch culture growth of *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 and *M. bovis* BCG Tokyo, and four field strains of *M. bovis* (I, II, III, IV), was carried out in modified Middlebrook 7H9 in order to characterize the *in vitro* physiological and transcriptional responses of these strains to environmental conditions mimicking host microenvironment, such as oxidative and nitrosative stresses and the presence of cholesterol. To compare the physiological responses of various strains following exposure to the imposed conditions, several parameters were determined: the absorbance at 590 nm of crystal violet-stained, surface-adherent, cell fractions; the viable cell count; the survival rate; and the specific growth rates. For *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 and *M. bovis* BCG Tokyo, the presence in growth media of compounds that cause oxidative stress (hydrogen peroxide, citric acid, ascorbic acid and methyl viologen), exerted highly significant differences ( $p < 0.001$ ) in biofilm formation, specifically in the presence of 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 15 mM ascorbic acid or 150 mM of methyl viologen, causing a decrease in survival of over 50%; 10 mM citric acid caused significant differences ( $p < 0.05$ ) in comparison with 7H9 control. When cells were grown in the presence of citric acid and ascorbic acid, biofilm formation is observed on the bottom of the well, but not in suspension, which contrasts with our observations when other compounds are tested. Sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>) and sodium nitroprusside (SNP) were tested because of their capacity to generate nitrosative stress. At a concentration of 25mM NaNO<sub>2</sub>, there are very significant differences ( $p < 0.001$ ) on biofilm formation and survival of the population is reduced by 50%. In the presence of SNP, the highest values of biofilm are obtained, when compared to the control, with highly significant differences ( $p < 0.001$ ) occurring in response to a concentration of 25 mM. The low survival in the presence of this compound, together with the concomitant increase in the number of adherent cells, suggests that nitrosative stress may promote biofilm growth. In the presence of cholesterol, there are no significant differences between the control and the tested condition, for the various strains under study. The influence of sodium chloride in biofilm formation was also studied. Growth under the presence of 3% NaCl induced very significant differences ( $p < 0.001$ ), leading to a reduction in biofilm formation and to less than 20% cell survival.

In *M. bovis* virulent strains, the presence of 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or 25mM NaNO<sub>2</sub> in growth media decreases biofilm, with highly significant differences ( $p < 0.001$ ) being observed. Also in *M. bovis* strains I and II, NPS is the only compound where higher values of biofilm are achieved in the presence of stress, with

highly significant differences ( $p < 0.001$ ) compared to the control condition. In the presence of cholesterol, there are no significant differences.

The transcriptional profiling of *Rv1358* and *sigF* genes was established in two field *M. bovis* strains (I and II), indicating strain-dependent transcriptional responses to different environmental stimuli. Sub-expression of *Rv1358* and *sigF* was observed in most of the environmental stress conditions studied. It's important to highlight ascorbic acid effect, which induces a different transcriptional response depending on the tested strain: the expression of *Rv1358* and *sigF* is increased nine- and eight-fold, respectively, in *M. bovis* I, but is reduced in *M. bovis* II.

The construction of a deletion mutant using a specialized transduction strategy was delineated and advanced in this work in order to study the role of the *Rv1358* in mycobacterial physiology. The construction of a phagemid in which the upstream and downstream regions of *Rv1358* were cloned was successful. After completion, in the future, of mutant construction, functional and phenotypic comparative analyses of the mutant versus wild type strain will be enabled, thus giving an important contribution to the functional analysis of *M. tuberculosis* complex genes and, in particular, to assess the importance of this gene in response to several environmental stresses characteristic of the host. Finally, to further confirm in the future that *Rv1358* has suffered pseudogenization in *M. tuberculosis*, its active transcription in articulation with the transcriptome of MTC should be determined and the potential ability of the transcript to exert a regulatory effect in different physiological conditions, namely over its parental gene, should be explored.

Key terms: *Mycobacterium bovis*, tuberculosis, biofilms, oxidative and nitrosative stress, *Rv1358*

## Índice Geral

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	ii
Abstract (Resumo em inglês) .....	vi
Índice de Tabelas.....	xiii
Índice de Figuras.....	xiv
Lista de abreviaturas .....	xvi
1. Introdução .....	1
1.1 Impacto da tuberculose humana e tuberculose animal .....	1
1.2 O Género <i>Mycobacterium</i> .....	1
1.2.1 O complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	1
1.2.2 Caraterísticas morfológicas e estruturais.....	2
1.2.3 Requisitos de crescimento e metabolismo energético .....	3
1.2.4 Organização do genoma.....	3
1.3 Interação micobactérias-hospedeiro .....	3
1.3.1 Sobrevivência das micobactérias patogénicas no interior dos macrófagos .....	3
1.3.2 Formação do granuloma .....	5
1.4 Biofilmes.....	5
1.4.1 Caraterísticas gerais dos biofilmes e relevância no contexto da infeção.....	5
1.4.2 Biofilmes no género <i>Mycobacterium</i> .....	6
1.5 Comunicação inter-celular no contexto do processo de infeção.....	6
1.5.1 Caraterísticas gerais dos processos de regulação por <i>quorum-sensing</i> .....	6
1.5.2 Família LuxR em micobactérias .....	7
2. Introdução ao tema da tese e objetivos.....	7
3. Material e Métodos.....	8
3.1 Caraterização e anotação de polimorfismos por análise bioinformática .....	8
3.1.1 Análise <i>in silico</i> do gene <i>Rv1358</i> e da proteína <i>Rv1358</i> .....	8
3.1.2 Estudo da presença de polimorfismos por análise bioinformática de genomas e caraterização dos domínios estruturais e modelação da estrutura 3D da proteína <i>Rv1358</i> .....	8
3.1.3 Análise de polimorfismos do gene <i>Rv1358</i> em isolados de campo de <i>M. bovis</i> com base em PCR e sequenciação subsequente .....	9

3.2	Origem e caracterização de todas as estirpes e/ou dos plasmídeos usados nos ensaios de crescimento e/ou na construção de um mutante de eliminação do gene <i>Rv1358</i> .....	9
3.3	Manutenção das culturas, condições de crescimento em meio sólido e preparação de pré-inóculos para o crescimento em meio líquido .....	10
3.4	Acompanhamento do crescimento celular de <i>M. bovis</i> na presença de múltiplos stresses ....	10
3.5	Determinação da concentração sub-inibitória do nitroprussiato de sódio .....	11
3.6	Ensaio para avaliação do efeito da adição de stresse na formação de biofilmes em micobactérias .....	11
3.7	Análise estatística dos resultados .....	12
3.8	Estimativa do nível de expressão dos genes <i>Rv1358</i> e <i>sigF</i> .....	12
3.8.1	Recolha de amostras celulares.....	12
3.8.2	Extração, verificação de integridade e quantificação de RNA .....	12
3.8.3	Quantificação relativa da expressão genética do gene <i>Rv1358</i> e <i>sigF</i> por RT-qPCR .....	13
3.9	Construção de um mutante de eliminação do gene <i>Rv1358</i> .....	13
3.9.1	Construção do cósmido pYUB854- <i>Rv1358</i> .....	13
3.9.2	Ligação entre o cósmido pYUB854- <i>Rv1358</i> e o fagemídeo phAE 159, transfeção e eletrotransformação de culturas de <i>E. coli</i> e de <i>M. smegmatis</i> .....	14
4.	Resultados e Discussão.....	15
4.1	Enquadramento do gene <i>Rv1358</i> no genoma dos membros do MTC, funções biológicas atribuídas à proteína <i>Rv1358</i> e presumíveis interações .....	15
4.2	Comparação de genomas do MTC por análise bioinformática do gene <i>Rv1358</i> .....	16
4.2.1	Análise comparativa da sequência nucleotídica do gene <i>Rv1358</i> nos genomas de bactérias do MTC.....	16
4.2.2	Análise de polimorfismos no gene <i>Rv1358</i> em estirpes clínicas de <i>M. tuberculosis</i> que circulam a nível mundial.....	18
4.2.3	Verificação da existência de polimorfismos no gene <i>Rv1358</i> em isolados de campo de <i>M. bovis</i> .....	18
4.3	Análise comparativa de sequências aminoácidas da proteína <i>Rv1358</i> em isolados clínicos do MTC para averiguação da presença de SNPs .....	19
4.4	Previsão <i>in silico</i> da estrutura terciária da proteína <i>Rv1358</i> .....	19
4.5	Avaliação da resposta fisiológica de micobactérias selecionadas a condições de stresse ambiental que mimetizam o ambiente do hospedeiro: efeito na formação de biofilmes .....	20
4.5.1	Avaliação do efeito do peróxido de hidrogénio, do metil de viologénio, do ácido cítrico e do ácido ascórbico, no crescimento de <i>M. smegmatis</i> e <i>M. bovis</i> BCG Tokyo .....	20

4.5.2	Avaliação do efeito de nitrito de sódio e nitroprussiato de sódio no crescimento de <i>M. smegmatis</i> e <i>M. bovis</i> BCG Tokyo em biofilmes.....	21
4.5.3	Avaliação do efeito do colesterol no crescimento de <i>M. smegmatis</i> e <i>M. bovis</i> BCG Tokyo em biofilmes.....	22
4.5.4	Efeito da presença de cloreto de sódio no crescimento de <i>M. smegmatis</i> e <i>M. bovis</i> BCG Tokyo em biofilmes .....	23
4.6	Avaliação da resposta fisiológica de estirpes virulentas de <i>M. bovis</i> a condições de stresse ambiental previamente estabelecidas que mimetizam o ambiente do hospedeiro: efeito no crescimento celular em descontínuo e na formação de biofilmes .....	23
4.6.1	Efeito da presença de colesterol e de stresse oxidativo ou nitrosativo no crescimento celular em descontínuo.....	23
4.6.2	Efeito da presença de colesterol e dos stresses oxidativo e nitrosativo na formação de biofilmes.....	24
4.6.3	Relação entre a quantidade de biofilme formado e a sobrevivência das micobactérias selecionadas na presença de variados stresses ambientais .....	24
4.7	Determinação do perfil transcricional dos genes <i>Rv1358</i> e <i>sigF</i> durante o crescimento em descontínuo de <i>Mycobacterium bovis</i> nas condições de stresse estabelecidas.....	25
4.8	Construção do mutante de eliminação do gene <i>Rv1358</i> .....	27
5.	Discussão final e perspectivas futuras .....	28
6.	Referências Bibliográficas.....	30
7.	Anexos .....	37

## Índice de Tabelas

Tabela 4.1 - Comparação de sequências nucleotídicas de estirpes de <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i> para o gene <i>Rv1358</i> , usando como referência o genoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, com anotação dos polimorfismos encontrados. ....	17
Tabela 4.2– Anotação dos polimorfismos identificados em 341 sequências nucleotídicas do gene <i>Rv1358</i> a partir da análise de genomas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> depositadas na base de dados PolyTB.....	18
Tabela 4.3- Comparação de 56 sequências da proteína Rv1358 obtidas de genomas do complexo <i>M. tuberculosis</i> , com anotação dos polimorfismos encontrados na base de dados <i>NCBI</i> .....	19
Tabela 4.4– Tabela com os coeficientes de determinação das condições estudadas em cada estirpe. ....	25

## Índice de Figuras

Fig.4.1–A: Locus genético onde se encontra inserido o gene <i>Rv1358</i> (adaptado de [50]). B: Representação esquemática efetuada no programa <i>Illustrator for Biological Sequences</i> (IBS), dos domínios presentes na proteína <i>Rv1358</i> com base na análise da sequência aminoacídica de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv efetuada na base de dados CDD.....	15
Fig. 4.2– Esquema das interações previstas <i>in silico</i> entre a proteína <i>Rv1358</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv outras proteínas/genes presentes no seu genoma.....	16
Fig. 4.3– Cladograma dos isolados de <i>M. bovis</i> (à esquerda) e <i>M. tuberculosis</i> (à direita) analisados, evidenciando os eventos microevolutivos do gene <i>Rv1358</i> , com base nos polimorfismos identificados e assinalando-se a vermelho os SNPs, a azul as eliminações e a verde as inserções. ....	17
Fig. 4.4– A: Alinhamentos das sequências dos fragmentos de <i>Rv1358</i> amplificados a partir do genoma dos isolados de campo de <i>M. bovis</i> para averiguação da presença dos polimorfismos nucleotídicos identificados por análise bioinformática de estirpes de <i>M. bovis</i> , que se encontram assinalados nas caixas azuis. B: Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação de um fragmento do gene <i>Rv1358</i> obtidos por PCR. MM: Marcador de massas moleculares HyperLadder III ( <i>Bioline</i> ). ....	18
Fig. 4.5– Modelos tridimensionais obtidos por pesquisa de homologia na base de dados Phyre das sequências aminoacídicas da proteína <i>Rv1358</i> (A) e da proteína <i>Rv1358</i> com mutações nos domínios ATPase (B) e LuxR (C). As extremidades e os diferentes domínios encontram-se representados a cores: extremidades N terminal (violeta) e C terminal (vermelho); domínio de ciclase (azul/verde), de ATPase (amarelo/laranja), e de LuxR (vermelho).....	20
Fig. 4.6–A: Representação do crescimento em microplaca (à esquerda) com o peróxido de hidrogénio, ácido ascórbico, ácido cítrico e metil de viologénio e após o tratamento com o corante violeta de cristal (à direita), onde I representa <i>M. smegmatis</i> e II representa <i>M. bovis</i> BCG Tokyo. B: Quantificação da quantidade de biofilme formado e da sobrevivência de <i>M. smegmatis</i> (após uma semana) e <i>M. bovis</i> BCG Tokyo (após três semanas) na presença de peróxido de hidrogénio (2mM e 9 mM), ácido ascórbico (10 mM e 15 mM), ácido cítrico (5 mM e 10 mM) e metil de viologénio (25 µM, 50 µM, 100 µM e 150 µM). ....	21
Fig. 4.7- A: Quantificação e comparação de biofilme formado e da taxa de sobrevivência de <i>M. smegmatis</i> (após uma semana) e <i>M. bovis</i> BCG Tokyo (após três semanas) quando cultivado na presença de nitrito de sódio (5mM, 10 mM e 25 mM) e nitroprussiato de sódio (25 mM e 100 mM). B: Representação do crescimento em microplaca (à esquerda) com o nitrito de sódio e nitroprussiato de sódio e após o tratamento com o corante violeta de cristal (à direita), onde I representa <i>M. smegmatis</i> e II representa <i>M. bovis</i> BCG Tokyo. C - Determinação da concentração sub-inibitória de NPS nas estirpes <i>M. smegmatis</i> e <i>M. bovis</i> BCG Tokyo.....	22
Fig. 4.8- Parâmetros de crescimento obtidos para <i>M. bovis</i> II durante o crescimento celular em descontínuo, em frascos de cultura celular contendo 7H9 (controlo) ou 7H9 modificado pela adição de Tween® 80, colesterol, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ácido ascórbico, de MV, de NaNO <sub>2</sub> ou NPS. A- Abs <sub>600nm</sub> vs tempo; B-	



Concentração de células viáveis (log UFCs/ml) vs tempo. C - Taxa específica de crescimento ( $\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )).	23
Fig. 4.9- A: Quantificação e comparação da quantidade de biofilme formado e da sobrevivência de <i>M. bovis</i> I, II, III e IV (após três semanas) na presença de peróxido de hidrogénio (2 mM e 9 mM), nitrito de sódio (5 mM, 10 mM e 25 mM), colesterol (1 mg/ml) e nitroprussiato de sódio (25 mM e 100 mM). B: Representação do crescimento em microplaca (à esquerda) com nitroprussiato de sódio e após o tratamento com o corante violeta de cristal (à direita), onde III representa <i>M. bovis</i> I e IV representa <i>M. bovis</i> II.	24
Fig. 4.10- A: Eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v) de amostras de RNA, para verificar a sua integridade. MM: Marcador de massas moleculares HyperLadder III ( <i>Bioline</i> ). B: Exemplo de curva de dissociação ( <i>melting curve</i> ) do teste de optimização de PCR em tempo real efetuado com DNA, para o gene <i>Rv1358</i> . C: Exemplo de curva de dissociação ( <i>melting curve</i> ) de condições em estudo, para o gene <i>Rv1358</i> .	26
Fig.4.11– Expressão genética dos genes <i>Rv1358</i> e <i>sigF</i> , na presença dos múltiplos stresses determinados por RT-qPCR (nas estirpes <i>M. bovis</i> I e II). O nível de expressão do gene <i>Rv1358</i> para cada condição de stresse foi obtido após normalização com o nível de expressão do gene de referência <i>rRNA 16S</i> que também foi determinado em simultâneo para cada condição controlo e condição de stresse.	26
Fig.4.12– A e B: Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação por PCR das extremidades 5' e 3' do gene <i>Rv1358</i> (fragmentos com 1200 pb). C: Eletroforese em gel de agarose a 1% para a verificação da construção do cosmídeo (vetor pYUB854 já com a inserção do fragmento 5') confirmação da inserção do fragmento 3', com 1200 bp)). 1, 2, 7 e 11: não transformantes; 3,4,5,6,8,9,10,12: transformantes; MM1 : Marcador de Peso molecular Ladder III Nzytech ( <i>Nzytech</i> ); MM2 : Marcador de massas moleculares Ladder VI Nzytech ( <i>Nzytech</i> ). D: Eletroforese em gel de agarose a 1% para a verificação da ligação do cosmídeo ao fagemídeo. Do 1 ao 5: presença de ligação (fragmento superior a 10 kb); 6: ausência de ligação; MM : Marcador de massas moleculares Ladder III Nzytech ( <i>Nzytech</i> ).	27

## Lista de abreviaturas

A – Adenina  
Abs<sub>600nm</sub> – Absorvância a 600 nm  
ADS – Suplemento com fração V da albumina sérica bovina, glucose e cloreto de sódio  
ATCC – *American Type Culture Collection*  
ATP – Adenosina trifosfato  
BAARs – Bacilos álcool-ácido resistentes  
BCG – Bacilo Calmette-Guérin  
C – Citosina  
°C – Graus Celsius  
cAMP – Adenosina monofosfato cíclico  
cGMP – Guanosina monofosfato cíclico  
cDNA – DNA complementar  
DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*)  
DEPC – Pirocarbonato de dietil (do inglês, *Diethylpyrocarbonate*)  
DETA – Dietilenotriamina (do inglês, *diethylenetriamine*)  
DMSO – Dimetilsulfóxido, (do inglês, *Dimethyl sulfoxide*)  
DO – Densidade óptica  
*E.* – *Escherichia*  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*)  
G – Guanina  
GC – Guanina e Citosina  
GTP – Guanosina trifosfato  
h – Hora  
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*)  
IFN-γ – Interferão gama  
IL – Interleucina  
INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária  
kb – Kilobases  
LB – Meio de cultura *Luria-Bertani* (do inglês *Luria-Bertani Broth*)  
*M.* – *Mycobacterium*  
min – Minuto  
ml – Mililitro  
mM – Milimolar  
mRNA – RNA mensageiro (do inglês, *messenger RNA*)  
MTC - Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (do inglês, *Mycobacterium tuberculosis complex*)  
nº – Número  
NCBI – National Center for Biotechnology Information  
NEB – New England Biolabs  
nm – Nanómetros  
NPS – Nitroprussiato de sódio  
p – *p value*  
pb – Pares de bases  
PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)  
QS – *Quorum sensing*

RDs – Regiões de diferença (do inglês, *Regions of Difference*)  
 RFU – Unidade relativa de fluorescência (do inglês, *Relative Fluorescence Unit*)  
 RNIs – Intermediários reativos de azoto (do inglês, *Reactive Nitrogen Intermediates*)  
 ROIs – Intermediários reativos de oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Intermediates*)  
 rpm – Rotações por minuto  
 rRNA – RNA ribossomal (do inglês, *ribosomal RNA*)  
 qRT-PCR – PCR em tempo real via transcriptase reversa (do inglês, *Real-time reverse transcription polymerase chain reaction*)  
 s – segundos  
 SB – Spoligotipo *Bovis* (do inglês, *Spoligotype Bovis*)  
 SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida  
 SNP's – Polimorfismos de nucleótido único (do inglês *single nucleotide polymorphism*)  
 T – Timina  
 TbD1 – *M. tuberculosis specific deletion 1*  
 TC – Linfócito T *cytotoxic*  
 TCA – Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (do inglês, *tricarboxylic acid cycle*)  
 TH1 – Linfócito T *helper 1*  
 TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (do inglês, *tumor necrosis factor  $\alpha$* )  
 RT - Transcriptase reversa (do inglês *Reverse transcriptase*)  
 U – Unidades  
 V – Volts  
 vs – *versus*  
 U – Uracilo  
 UFC – Unidades formadoras de colônias  
 $\mu$ l – Microlitro  
 $\mu$ m – Micrometro  
 $\mu$ M – Micromolar  
 $\mu$ max – Taxa específica máxima de crescimento

## **1. Introdução**

### **1.1 Impacto da tuberculose humana e tuberculose animal**

A tuberculose é uma doença infecciosa de etiologia bacteriana que afeta a Humanidade há milénios. Estudos recentes sugerem um cenário de co-evolução entre o Homem e o agente da tuberculose, durante o qual as micobactérias desenvolveram estratégias para superar a resposta imunitária e persistir no hospedeiro humano<sup>1</sup>. Na literatura Grega, o médico Hipócrates utilizou a denominação *phthisis* para a descrever. Em 1882, Robert Koch identificou e descreveu o agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis*<sup>2</sup>. A principal via de transmissão de *M. tuberculosis* é a inalação de aerossóis<sup>3</sup>. A partir de 1921, iniciou-se a era da vacinação, com a vacina viva atenuada *M. bovis* BCG, que muito contribuiu para a prevenção e controlo da doença, juntamente com a antibioterapia e melhoria das condições de vida da maioria da população<sup>2</sup>. No entanto, na atualidade, a tuberculose permanece um problema de saúde pública, responsável pela morte de milhões de pessoas, em resultado do aumento do número de casos devido à co-infecção com VIH-SIDA e a emergência de resistência das estirpes clínicas em circulação aos compostos antituberculares. As últimas estatísticas apontam para 9.6 milhões de novos casos e 1.5 milhões de mortes devido a tuberculose, em 2014<sup>4</sup>.

A tuberculose animal é uma doença infeto-contagiosa, endémica em algumas regiões do mundo, que afeta animais de produção, animais de companhia e espécies selvagens, sendo possível a sua transmissão ao Homem. Trata-se de uma zoonose com implicações em saúde pública e elevado impacto socioeconómico, pois a sua persistência constitui um obstáculo à livre circulação de animais e de produtos de origem animal, podendo também por em causa a biodiversidade. A maioria dos países desenvolvidos possui programas de erradicação, o que tem contribuído para a redução da incidência desta doença naquelas regiões<sup>5</sup>. Nas populações animais, apesar de existirem outras vias de transmissão diretas e indiretas, a principal via de transmissão da tuberculose é a aerógena, por inalação de aerossóis expelidos de pulmões de animais infetados<sup>6</sup>. Os bovinos são o principal reservatório para a sua espécie, podendo também transmitir o agente a espécies selvagens. Contudo, a sobrepopulação de caça maior (veado e javali), ou elevadas densidades de outras espécies (por exemplo, carnívoros), têm impacto na transmissão do microrganismo ao nível intra- e inter-específico, podendo também atuar como reservatório para os animais domésticos<sup>7</sup>. A tuberculose humana de origem zoonótica pode resultar da ingestão de laticínios não pasteurizados contaminados com *M. bovis*, ou do contato próximo com animais infetados<sup>5,7</sup>.

### **1.2 O Género *Mycobacterium***

#### **1.2.1 O complexo *Mycobacterium tuberculosis***

As bactérias do género *Mycobacterium* pertencem à família Mycobacteriaceae, família que se integra na ordem Actinomycetales, classe Actinobacteria, filo Actinobacteria, e domínio Bacteria<sup>8,9</sup>. O género *Mycobacterium* engloba mais de 170 espécies, sendo algumas agrupadas em complexos, como o complexo *M. tuberculosis* (MTC)<sup>10</sup>. O MTC é constituído por várias espécies com importância em saúde humana e animal, nomeadamente: *M. canettii*; *M. africanum*; *M. pinnipedii*; *M. microti*; *M. caprae*; *M. bovis*; e *M. tuberculosis*. Os membros do MTC apresentam tropismo para um determinado hospedeiro ou grupo de hospedeiros. Por exemplo, *M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. canettii* estão associados à infeção em humanos; *M. bovis* aos bovinos, *M. caprae* aos caprinos, *M. pinnipedii* às focas e *M. microti* aos roedores<sup>11</sup>. Apesar da elevada homologia existente entre os seus genomas, as espécies do MTC apresentam diferenças fenotípicas que se julga resultarem da adaptação dos microrganismos a diferentes hospedeiros, evidenciando ainda diferenças na virulência<sup>11</sup>. Os processos evolutivos dos membros do complexo MTC têm sido caracterizados por eliminações sucessivas e irreversíveis de regiões do genoma (apeladas Regiões de Diferença (RDs)). As estirpes de *M. tuberculosis* podem ser subdivididas em ancestrais e recentes, com base na eliminação (ou presença) de uma região específica designada por TbD1. A eliminação sucessiva destas regiões cromossómicas permitiu distinguir os ecotipos do complexo e definir a sua filogenia. A linhagem evolutiva representada por *M. africanum*, *M. microti*, e *M. bovis* é caracterizada pela eliminação da RD9<sup>11</sup>.

### **1.2.2 Características morfológicas e estruturais**

As bactérias deste género apresentam a morfologia de bastonetes (0,2 -0,6 µm de largura × 1,0-10 µm de comprimento) retilíneos ou ligeiramente encurvados, imóveis, não capsulados e não esporulados. A morfologia das colónias em meio de cultura sólido é variável, podendo apresentar pigmentação amarela e aspeto rugoso<sup>8</sup>. As micobactérias possuem uma parede celular espessa, rica em lípidos e ácidos micólicos, apresentando uma membrana citoplasmática à qual se sobrepõe uma camada de peptidoglicano que está ligada covalentemente a arabinogalactano. Os ácidos micólicos distribuem-se numa camada espessa e exterior, e são constituídos por uma cadeia longa com cerca de 60 a 90 átomos de carbono, encontrando-se ligados ao arabinano do arabinogalactano através de ligações éster. Contribuem para a manutenção da estrutura celular rígida e baixa permeabilidade, permitindo a resistência intrínseca a compostos hidrofílicos<sup>12</sup>. São produzidos por todas as micobactérias e conferem às células a propriedade de álcool-ácido resistência, sendo vulgarmente denominados bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). A retenção do corante fucsina e a não descoloração pela ação do álcool-ácido estão na base do método de coloração de Ziehl-Neelsen<sup>9,13</sup>. A natureza da parede celular não favorece o recurso à coloração de Gram, que é pouco informativa nestas bactérias, embora, do ponto de vista citoquímico, as micobactérias sejam classificadas como Gram-positivas<sup>9</sup>. Na camada externa, também estão presentes manósidos de fosfatidil inositol (PIM), lipoarabinomananos (LAM), glicolípidos de trealose, sulfolípidos, dimicolatos de trealose e glicolípidos fenólicos<sup>14</sup>.

### 1.2.3 Requisitos de crescimento e metabolismo energético

As bactérias do gênero *Mycobacterium* são aeróbicas e, dependendo da espécie, a sua temperatura de crescimento pode variar entre os 30°C e os 52°C<sup>9,15</sup>. Podem ser divididas em dois grupos com base na sua taxa de crescimento, o que permite classificá-las como micobactérias de crescimento rápido (crescimento até sete dias) ou de crescimento lento (período superior a sete dias)<sup>9,15</sup>. Relativamente ao metabolismo energético, *M. tuberculosis* é capaz de utilizar diversas fontes de carbono *in vitro* por recurso a vias metabólicas como a glicólise, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), a via das pentoses fosfato, o ciclo do glioxilato e o ciclo do metil citrato<sup>16</sup>. Em contraste com outras micobactérias do MTC, *M. bovis* não cresce em glicerol como única fonte de carbono, devido à presença de uma glicerol cinase (*glpK*) inativa. Acresce que todos os genes de *M. bovis* que codificam enzimas necessárias para a formação de piruvato não são funcionais, tal como o gene da piruvato cinase (*pykA*)<sup>16</sup>.

### 1.2.4 Organização do genoma

O genoma dos membros do MTC contém um elevado conteúdo em G+C que varia entre 62 e 70%<sup>8</sup>. A homologia das sequências do gene *rDNA 16S* dos membros do MTC é muito elevada, existindo uma semelhança superior a 99,99% entre espécies. Tem-se considerado que a troca de material genético por transferência horizontal é praticamente inexistente, apesar de evidências muito recentes sugerirem a permeabilidade destes microrganismos a fenómenos de conjugação distributiva que poderão levar a diversificação genética<sup>17,18</sup>. Assim, crê-se que a evolução das estirpes contemporâneas do MTC é maioritariamente clonal, assente em eliminações de sequências nucleotídicas, rearranjos e mutações pontuais no cromossoma<sup>11</sup>. O genoma de *M. tuberculosis* H37Rv tem 4,411,529 pares de base (pb)<sup>19</sup> e o genoma de *M. bovis* (*M. bovis* AF2122/97) tem 4,345,492 pb<sup>20</sup>. Na base da redução do tamanho do genoma de *M. bovis* está a eliminação do *locus* TbD1<sup>20</sup>. Todas as estirpes vacinais de *M. bovis* BCG partilham a eliminação da RD1, ao contrário de estirpes de *M. bovis* isoladas de animais e pessoas, sugerindo que esta região desempenha um papel importante na virulência das estirpes patogénicas. A região RD1 inclui os genes *esat6* e *cfp10* que codificam para proteínas altamente imunogénicas<sup>21</sup>.

## 1.3 Interação micobactérias-hospedeiro

### 1.3.1 Sobrevivência das micobactérias patogénicas no interior dos macrófagos

As primeiras lesões resultantes da infeção por via aérea surgem tipicamente a nível pulmonar, podendo a doença evoluir ou manter-se num estado latente, dependendo do estado imunitário do hospedeiro e da virulência da estirpe. As micobactérias são detetadas pelo sistema imunitário do hospedeiro após a entrada no organismo e são internalizadas por macrófagos locais não ativados<sup>6</sup>. No processo normal de fagocitose, após a internalização das bactérias em fagossomas, ocorre a fusão dos mesmos com lisossomas e a consequente formação de fagolisossomas, nos quais as bactérias são

eficientemente destruídas. No entanto, algumas bactérias são capazes de sobreviver e persistir intracelularmente nos macrófagos<sup>22</sup>. As micobactérias são internalizadas nos fagossomas em domínios ricos em colesterol. Além disso, o colesterol é indispensável para o funcionamento da proteína coronina 1 presente nos fagossomas infetados com micobactérias, pois leva à inibição da fusão do fagossoma com o lisossoma, especulando-se assim que o colesterol tenha um papel importante durante a infeção e a persistência das micobactérias<sup>22,23</sup>. Uma vez no fagossoma e tendo impedido a fusão com o lisossoma, as micobactérias estabelecem-se no interior dos macrófagos, onde reside um ambiente no qual são capazes de sobreviver. As micobactérias evitam ou resistem a um conjunto de mecanismos que atuam nos lisossomas, nomeadamente a ação de enzimas hidrolíticas e consequente apresentação antigénica às células T do hospedeiro. Acresce que as micobactérias conseguem bloquear o processo de maturação do fagossoma. Determinantes moleculares da família das Rab GTP-ases desempenham um papel importante na maturação do fagossoma. As proteínas Rab5 e Rab7 estão presentes, respetivamente, nos endossomas precoces e tardios. Numa fase precoce, o fagossoma apresenta Rab5 e um pH pouco ácido (aproximadamente 6). Seguidamente, os fagossomas, utilizando processos de fusão e fissão, adquirem novas moléculas, formando um fagossoma tardio, caracterizado pelo desaparecimento de Rab5 e aparecimento de Rab7. Esta permite a fusão do fagossoma com o lisossoma e a acidificação do meio (pH <5). Especula-se que o processo de maturação do fagossoma seja bloqueado na etapa compreendida entre a perda de Rab5 e a aquisição de Rab7, apresentando uma composição membranar semelhante à dos endossomas precoces<sup>24</sup>. Além disso, a aquisição de bombas de prótons vacuolares (v-ATPases) durante o processo de maturação permite a acidificação dos fagossomas, donde se deduz que a ausência de v-ATPases é responsável pela reduzida acidificação dos fagossomas micobacterianos, equilibrando o pH a 6.2-6.3<sup>25</sup>. Estes macrófagos infetados acabam por ser destruídos devido à necrose induzida pelas micobactérias e os bacilos são libertados e de novo incorporados por outros macrófagos, provenientes da resposta inflamatória local<sup>24,25</sup>. Um dos mecanismos bactericidas dos macrófagos é a produção de intermediários reativos de oxigénio (ROIs), tais como o anião superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), e o singuleto de dioxigénio ( $^1O_2$ ). As micobactérias têm a capacidade de inibir a produção de ROIs, produzindo enzimas que os degradam, nomeadamente catalases, peroxidases e superóxido dismutases<sup>26</sup>. *M. tuberculosis* produz uma catalase-peroxidase, KatG, codificada por *katG*, que degrada  $H_2O_2$  em água e oxigénio numa única reação. As enzimas superóxido dismutase SodA e SodC são responsáveis por catalisarem a dismutação do  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$  e são codificadas respetivamente por *sodA* e *sodC*<sup>26</sup>. O óxido nítrico (NO), produzido nos macrófagos, possui uma atividade antimicrobiana devido à formação de intermediários reativos de azoto (RNIs) que incluem o peroxinitrito ( $NOO^-$ ), o ácido nitroso ( $HNO_2$ ) e o trióxido de azoto ( $N_2O_3$ ). O NO e os seus derivados podem reagir com o DNA

bacteriano, com lípidos e proteínas, e podem induzir apoptose na célula do hospedeiro, o que pode ser letal para os microorganismos intracelulares<sup>27</sup>.

### **1.3.2 Formação do granuloma**

A resposta imunitária específica à infecção é, predominantemente, do tipo celular. Os linfócitos *Th1* (*T helper 1*) produzem citocinas, como a IL-12 (interleucina 12), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) e o IFN- $\gamma$  (interferão  $\gamma$ ), responsáveis pela ativação e regulação dos macrófagos, contribuindo, deste modo, para a formação do granuloma<sup>28</sup>. À medida que a resposta imunitária avança, forma-se um granuloma em redor dos macrófagos infectados, por vezes com necrose caseosa central, cujo centro é constituído por uma estrutura semi-sólida pobre em oxigénio e rica em lípidos e proteínas derivadas de células mortas, bem como por bactérias. As micobactérias persistentes ficam contidas nestas estruturas granulomatosas num estado dormente, podendo sobreviver no seu interior durante décadas<sup>29</sup>. Vários estudos sugerem que o sistema de transdução DosR/DosS/DosT, cuja expressão em *M. tuberculosis* é ativada em resposta à hipoxia, é determinante no início do processo de dormência<sup>30</sup>. Na presença de condições de aerobiose, as proteínas sensoras DosT e DosS encontram-se saturadas com O<sub>2</sub> e a sua atividade cinásica está inibida. Perante condições de hipoxia, DosT e DosS existem predominantemente no estado desoxidado, tendo uma função ativa de cinase e fosforilando um regulador de resposta. A fosforilação de DosR por qualquer um dos componentes DosT ou DosS em condições de hipoxia desencadeia uma resposta específica na célula<sup>31</sup>. Estudos anteriores demonstraram que o regulão DosR está envolvido na regulação de, pelo menos, 50 genes<sup>30</sup> e a análise do transcrito de *M. tuberculosis* por *microarrays* demonstrou que *dosR* é quatro vezes mais expresso em condições de carência de oxigénio<sup>32</sup>. Por outro lado, a resposta à hipoxia parece estar aparentemente correlacionada com o fenótipo de latência de *M. tuberculosis*<sup>31</sup>. As micobactérias possuem um sistema de secreção especializado na exportação de proteínas efetoras para a célula hospedeira, nomeadamente o sistema de secreção de tipo VII ESX-1 que deposita moléculas efetoras e fatores de virulência no hospedeiro (por exemplo, as proteínas ESAT6 e CFP10, que estão envolvidas na interação entre as micobactérias e o hospedeiro<sup>33</sup>).

## **1.4 Biofilmes**

### **1.4.1 Características gerais dos biofilmes e relevância no contexto da infecção**

Um biofilme pode ser definido como uma comunidade biológica com elevado grau de organização, sendo constituído por células aderentes a uma superfície inerte ou viva, que estão embebidas numa matriz polimérica<sup>34,35</sup>. Na natureza, a maior parte dos microorganismos existe associado a este tipo de estruturas, uma vez que os biofilmes maduros fornecem microambientes adequados ao desenvolvimento de uma subpopulação de células tolerante a stresses e persistente<sup>36</sup>. De um modo geral, o processo de formação do biofilme consiste, numa primeira fase, na adesão de células a uma



superfície sólida, seguindo-se a formação de microcolónias, a diferenciação em macrocolónias e maturação do biofilme e, finalmente, a dispersão de células, as quais irão colonizar novas superfícies<sup>37</sup>.

#### **1.4.2 Biofilmes no género *Mycobacterium***

Em infeções humanas, a associação dos microrganismos em biofilmes pode proteger a célula microbiana da ação do sistema imunitário do hospedeiro e da pressão seletiva exercida por antibióticos<sup>38</sup>. Em duas espécies de micobactérias não tuberculosas, foi recentemente descrita a formação de biofilmes *in vitro* por *M. avium*<sup>39</sup> e *in vivo* por *M. ulcerans*<sup>40</sup>. O fenótipo de latência característico da infeção causada por *M. tuberculosis*, com menor taxa de replicação intracelular, resistência a compostos antimicrobianos e proteção a agressões ambientais em resultado do enclausuramento e compartimentação das micobactérias no granuloma, apresenta semelhanças com o fenótipo exibido por células organizadas em biofilme. Apesar de experimentalmente se terem reunido ainda escassas evidências, estas similaridades sugerem que os biofilmes possam ser um estilo de vida adotado por *M. tuberculosis in vivo*, contribuindo para a sua latência e persistência<sup>30</sup>. Num estudo recente, demonstrou-se que mutantes de *M. tuberculosis* nos genes *pks1* e *pks15*, cujos produtos estão envolvidos na biossíntese de glicolípidos fenólicos, apresentam deficiências na capacidade de formação de biofilmes *in vitro*, sugerindo-se o seu envolvimento naquele processo<sup>41</sup>.

### **1.5 Comunicação inter-celular no contexto do processo de infeção**

#### **1.5.1 Características gerais dos processos de regulação por *quorum-sensing***

*Quorum sensing* (QS) é um processo amplamente distribuído em eubactérias que envolve comunicação célula a célula, pela acumulação extracelular de moléculas sinalizadoras denominadas autoindutoras. Estas moléculas são secretadas para o exterior da célula, podendo ou não sofrer processamento, e acumulam-se no meio extracelular à medida que a densidade da população aumenta, permitindo aos microrganismos monitorizar e detetar mudanças no meio ambiente, conduzindo a alterações da expressão genética. O processo de QS envolve a regulação de genes que controlam atividades que são benéficas quando realizadas por bactérias que atuam em sincronia. Entre os processos controlados por *quorum sensing* em variados microrganismos, encontram-se a formação de biofilmes e de exopolissacáridos, a expressão de fatores de virulência, nomeadamente toxinas, a transferência horizontal de genes e a bioluminescência, entre outros<sup>42</sup>. Relativamente ao sistema LuxI/LuxR, um dos sistemas canónicos de QS mais comuns em bactérias gram-negativas, o qual também se encontra presente em gram-positivas, verifica-se que as moléculas autoindutoras são codificadas por genes do tipo *luxI*, difundindo-se livremente através da membrana interna e externa. Quando a concentração de moléculas autoindutoras é suficientemente elevada, estas ligam-se a recetores citoplasmáticos e a fatores de transcrição codificados por genes do tipo *luxR*, que vão posteriormente regular a expressão de genes do regulão QS<sup>42</sup>. Têm surgido questões sobre o impacto

destas moléculas sinalizadoras, não só numa espécie bacteriana, como também em bactérias que partilham o mesmo nicho ecológico e em organismos superiores<sup>43,44</sup>. Estas moléculas possuem uma ampla atividade biológica nas bactérias. Um exemplo, é a molécula N- (3-oxododecanoil) homoserina lactonas (3-oxo-C12-HSL), que é produzida por *Pseudomonas aeruginosa* e apresenta atividades antibacterianas, farmacológicas e imunomoduladoras<sup>45</sup>. No entanto, ainda existe pouca informação sobre o papel das moléculas sinalizadoras nas bactérias e o seu impacto nas células do hospedeiro.

### 1.5.2 Família LuxR em micobactérias

A família LuxR constitui uma família de proteínas de ligação ao DNA, caracterizando-se pela presença de um domínio regulatório LuxR do tipo hélice-volta-hélice (do inglês, *helix-turn-helix*, HTH) na região C-terminal<sup>46</sup>. Em *M. tuberculosis* H37Rv, foram identificados oito genes com domínios característicos LuxR, nomeadamente, *Rv0195*, *Rv0386*, *Rv0491*, *Rv0890c*, *Rv0894*, *Rv1358*, *Rv2488c* e *Rv3133c*<sup>46</sup>. Em várias espécies de microrganismos patogénicos, os reguladores LuxR estão envolvidos em fenómenos de QS, sendo responsáveis por modular vários tipos de resposta, nomeadamente a formação de biofilmes e a resposta imunitária do hospedeiro<sup>46</sup>. A comparação *in silico* dos genomas de várias espécies de micobactérias demonstrou que a presença de genes do tipo LuxR está sobretudo associada a espécies patogénicas, especulando-se que possa ter um papel importante na persistência e virulência das micobactérias<sup>47</sup>. Recentemente, demonstrou-se que a sobre-expressão do gene *MAP0482* (gene do tipo LuxR) em *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* aumenta a eficiência de infeção *in vitro*, em linhas celulares epiteliais bovinas<sup>48</sup>. Destaca-se ainda o caso particular da subfamília LuxR associada a domínios homólogos de adenil ciclase em Actinobactérias, pois parece ser restrito aos membros do género *Mycobacterium*, tendo-se identificado domínios característicos nos genes *Rv0386*, *Rv1358* e *Rv2488c*, com base em pesquisas de homologia nas bases de dados<sup>46</sup>. A consulta de resultados de transcritómica (*microarrays*) sugere também que a transcrição do gene *Rv1358* seja regulada pelo gene *sigF*, o qual codifica um fator sigma alternativo, recrutado em resposta ao stresse oxidativo e nitrosativo, uma vez que a análise bioinformática da ORF (*open reading frame*) de *Rv1358* apresenta um local alternativo de transcrição com evidência de regiões consenso características de *sigF*<sup>49</sup>.

## 2. Introdução ao tema da tese e objetivos

A análise comparativa de genomas de *M. tuberculosis* e de outras bactérias do complexo MTC sugere que o gene *Rv1358* seja um presumível regulador transcricional pertencente à família LuxR, a qual inclui genes cujos produtos estão envolvidos, noutros microrganismos, em fenómenos de regulação da expressão genética, mediados por *quorum sensing*. Este trabalho teve como objetivo identificar as condições ambientais que favorecem a formação de biofilmes por bactérias do complexo *M. tuberculosis* e explorar a diversidade e o papel do gene *Rv1358* na resposta a diferentes condições ambientais e no estabelecimento e maturação de biofilmes. Foram definidos como objetivos: (i) a

análise bioinformática dos polimorfismos do gene *Rv1358* em estirpes circulantes do MTC, com a modelação e caracterização das presumíveis consequências estruturais e funcionais e identificação experimental de polimorfismos no mesmo gene em estirpes de campo de *M. bovis*, por recurso à reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciação de Sanger; (ii) o estabelecimento de diferentes condições ambientais *in vitro* que potencialmente mimetizem o ambiente do hospedeiro e identificação de condições experimentais que promovam biofilmes micobacterianos, utilizando estratégias experimentais de crescimento em descontínuo ou ensaios em microplaca. (iii) a análise e comparação relativa do crescimento de isolados de campo de *M. bovis* quando expostos a condições de stresse preliminarmente estabelecidas; (iv) a análise transcricional dos genes *Rv1358* e *sigF* por quantificação relativa da sua expressão em condições de stresse que propiciam a formação de biofilmes; (v) a construção genética de um mutante de eliminação do gene *Rv1358*, por recurso a uma estratégia de transdução especializada.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Caracterização e anotação de polimorfismos por análise bioinformática**

##### **3.1.1 Análise *in silico* do gene *Rv1358* e da proteína *Rv1358***

A caracterização *in silico* do gene *Rv1358* e da proteína *Rv1358*, foi realizada através da consulta das seguintes bases de dados internacionais: *Tuberculist*<sup>50</sup>, *GeneOntology*<sup>51</sup>, *PolyTB*<sup>52</sup>, *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)<sup>53</sup>, *CDD*<sup>53</sup>, *InterPro*<sup>54</sup>, *Pfam*<sup>55</sup>, *TB database*<sup>56</sup>, *MTB Network Portal*<sup>57</sup>, *STITCH*<sup>58</sup>, *STRING*<sup>59</sup>, *Codon Usage*<sup>60</sup>, *ExPASy*<sup>61</sup>, *Phyre (Protein Homology/analogy Recognition Engine)*<sup>62</sup> e o programa *Illustrator for Biological Sequences* (IBS)<sup>63</sup>.

##### **3.1.2 Estudo da presença de polimorfismos por análise bioinformática de genomas e caracterização dos domínios estruturais e modelação da estrutura 3D da proteína *Rv1358***

As sequências nucleotídicas do gene *Rv1358* e aminoácidas da proteína *Rv1358* completas e depositadas na base de dados NCBI, foram retiradas com a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) utilizando o algoritmo *Megablast* e *blastp*, respetivamente. À data da entrega desta tese, tomou-se conhecimento da existência de uma nova anotação do genoma de *M. bovis* AF2122, lançada no segundo semestre de 2015, a qual não foi tomada em consideração na análise apresentada. Para *M. tuberculosis*, existem atualmente 26 anotações do genoma<sup>50</sup>. As sequências do tipo FASTA (*The Fast Adaptive Shrinkage Thresholding Algorithm*) de *M. bovis* e *M. tuberculosis* foram descarregadas e alinhadas no programa ClustalX v. 2.1. Utilizou-se como referência nos alinhamentos a sequência nucleotídica e aminoácida da estirpe *M. tuberculosis* H37Rv. Foram analisadas separadamente as sequências nucleotídicas de *M. bovis* (26), de *M. tuberculosis* (52) e sequências aminoácidas de estirpes do MTC (56). O número total de alterações nas sequências nucleotídicas e aminoácidas foi registado, agrupado e utilizado para inferir o(s) domínio(s) mais afetado(s). As informações relativas

aos genomas analisados encontram-se disponíveis na Tabela A7.1 (Anexo). Considerando a sequência de polimorfismos encontrados, realizou-se uma análise filogenética do gene *Rv1358*, tendo sido escolhidas sequências nucleotídicas com polimorfismos detectadas em quatro dos genomas de *M. bovis* analisados e em 10 dos genomas de *M. tuberculosis*. As árvores filogenéticas foram realizadas com recurso ao programa FigTree v1.4.2<sup>64</sup>. A estrutura dos domínios característicos do gene *Rv1358* foi obtida introduzindo a respetiva sequência nucleotídica da estirpe de *M. tuberculosis* H37Rv na ferramenta *Conserved Domain Database* (CDD), disponível na base de dados *NCBI*. Com base nos alinhamentos das sequências aminoacídicas, foram obtidos modelos 3D da estrutura prevista da proteína *Rv1358* em estirpes com alterações naquela região, nomeadamente *M. bovis* AF2122/ 97 (442\_D>A) e *M. tuberculosis* 1755BN (1112\_G>E), tendo os modelos obtidos sido comparados com o modelo de referência para H37Rv, também simulado neste trabalho. Os modelos das proteínas foram delineados utilizando a ferramenta Phyre v. 2.0<sup>62</sup>.

### **3.1.3 Análise de polimorfismos do gene *Rv1358* em isolados de campo de *M. bovis* com base em PCR e sequenciação subsequente**

Caraterizaram-se isolados de campo de *M. bovis* quanto à existência de polimorfismos no gene *Rv1358* por recurso a PCR e sequenciação. As amostras de DNA de *M. bovis* analisadas pertenciam ao INIAV, sendo a sua identificação e o genótipo determinado por *spoligotyping* os seguintes: 828 (SB0265), 1631 (SB1264), 1745 (SB1264), 1753 (SB0121), 2382 (SB1190), 6086 (SB0295) e H37Rv (referência). Para amplificar os fragmentos do gene *Rv1358*, utilizaram-se sequências oligonucleotídicas iniciadoras (*primers*) descritas por Santos e colaboradores (2015)<sup>47</sup>. As informações relativas à região amplificada, bem como as condições de hibridação dos *primers* estão descritas na Tabela A7.2 (Anexo) e as informações relativas às condições reacionais e condições de PCR encontram-se descritas na Tabela A7.3 (Anexo). Efetuou-se eletroforese (90V, 1h30 min) em gel de agarose a 0.8% (m/v), do qual foram excisados os fragmentos e extraído o DNA, usando o sistema comercial QIAprep® Spin Miniprep (*Qiagen*). As amostras foram diluídas em água e sequenciadas comercialmente pelo método de Sanger. A análise dos eletroferogramas, a elaboração das sequências de consenso e o alinhamento de sequências nucleotídicas foram realizados com recurso aos programas FinchTV, Genedoc e ClustalX v. 2.1, para verificar a presença de polimorfismos.

### **3.2 Origem e caracterização de todas as estirpes e/ou dos plasmídeos usados nos ensaios de crescimento e/ou na construção de um mutante de eliminação do gene *Rv1358***

As informações específicas relativas às estirpes utilizadas no contexto dos ensaios de crescimento em descontínuo ou em biofilme e/ou na construção de um mutante de eliminação encontram-se descritas na Tabela A7.4 (Anexo). As informações específicas relativas aos plasmídeos utilizados neste trabalho encontram-se na Tabela A7.5 (Anexo).

### 3.3 Manutenção das culturas, condições de crescimento em meio sólido e preparação de pré-inóculos para o crescimento em meio líquido

As culturas foram manipuladas em Laboratório de Segurança Biológica de Nível dois (BSL2), com exceção de *M. bovis* que foi manipulado em BSL3, de acordo com regras estritas de biossegurança. Após descongelamento, as estirpes de *M. bovis* BCG Tokyo e *M. bovis* foram crescidas em meio sólido Lowenstein Jensen piruvato (*Biogerm*), Stonebrink (*Biogerm*) e Middlebrook 7H10 (*BDDifco*<sup>TM</sup>) suplementado com 0.5% de piruvato de sódio (*Sigma-Aldrich*), 10% (v/v) de ADS (composição descrita na Tabela A7.6) e 0.05% de Tween<sup>®</sup> 80 (*Sigma-Aldrich*). As placas de Petri foram envolvidas em parafilme para evitar desidratação. Para *M. smegmatis* foi utilizado 7H10 suplementado com 5 ml de glicerol (86%v/v), 10% (v/v) de ADS e 0.05% de Tween<sup>®</sup> 80. No caso de *E. coli*, o crescimento foi efetuado em placa com meio LB. As culturas de *E. coli*/ pYUB854 e *E. coli*/ phAE 159 foram suplementadas com higromicina a 50 mg/ml (*Invitrogen*) e ampicilina a 100 mg/ml (*Nzytech*) respectivamente. As placas foram incubadas em condições de aerofilia a 37°C, durante quatro dias no caso de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, e por um período de um a dois meses no caso de *M. bovis* BCG Tokyo e *M. bovis*. Para *E. coli*, as placas foram inoculadas a 37°C durante um a três dias. As colônias resultantes foram transferidas para novas placas que foram incubadas nas condições anteriores, mas durante um dia para *E. coli*, dois dias para *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, sete dias para *M. bovis* BCG Tokyo e quatro a seis dias para *M. bovis*. Os pré-inóculos das diferentes estirpes foram preparados utilizando colônias isoladas, de acordo com as condições referidas neste ponto, sendo posteriormente transferidas para tubos Falcon de 50 ml (*Sarstedt*) e mantidas com agitação. Os pré-inóculos foram incubados a 37°C, durante 24h ou por um período extensível até três semanas, dependendo da estirpe, tal como se encontra indicado na Tabela A7.7 (Anexo).

### 3.4 Acompanhamento do crescimento celular de *M. bovis* na presença de múltiplos stresses

Após a seleção inicial das condições experimentais, as respostas fisiológicas à exposição dessas condições foram estudadas na estirpe virulenta *M. bovis* II. Foram realizadas curvas de crescimento com a adição dos seguintes compostos: 25 mM NaNO<sub>2</sub>; 9mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 25 mM nitroprussiato de sódio (NPS); 150 µM metil de viologénio (MV); 15 mM ácido ascórbico; Tween<sup>®</sup> 80 1% (v/v); e 1 mg/ml colesterol (composição e preparação descritas na Tabela A7.6). A inoculação foi efetuada em 100 ml de meio líquido Middlebrook 7H9 (*BDDifco*<sup>TM</sup>), em frascos de cultura celular de 600 ml (*Corning*) com Abs<sub>600 nm</sub> inicial de 0.1. O acompanhamento do crescimento foi efetuado a 37°C, sem agitação, e com a realização de duas experiências independentes. Para determinação da viabilidade celular e cálculo da sobrevivência, efetuaram-se diluições seriadas de base 10 em meio líquido 7H9, que foram inoculadas em placas de 7H10, como descrito no ponto 3.3, e envoltas em parafilme até à contagem das UFCs. A taxa específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) foi calculada segundo a fórmula  $\mu = (\ln Abs_2 - \ln Abs_1) / (t_2 - t_1)$ , em que apenas foram considerados os valores de Abs durante a fase exponencial.

### 3.5 Determinação da concentração sub-inibitória do nitroprussiato de sódio

Determinou-se a suscetibilidade e concentração sub-inibitória das culturas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 e *M. bovis* BCG Tokyo ao NPS, pois não existiam valores indicativos descritos na literatura. Para este teste, foram preparados meios sólidos em placa contendo meio 7H10, preparado como indicado no ponto 3.3, preparadas a partir de uma solução 1 M de NPS (Tabela A7.6), nomeadamente 1 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM e 100 mM. Inoculou-se cada placa contendo cada uma das concentrações testadas com 3 µl de suspensão celular de *M. smegmatis* e *M. bovis* (com Abs<sub>600nm</sub> de 0.5). Incubou-se como descrito no ponto 3.3. Observou-se a presença/ausência de crescimento e comparou-se o tamanho das colónias formadas, relativamente ao controlo. Foram realizadas duas experiências independentes.

### 3.6 Ensaios para avaliação do efeito da adição de stresse na formação de biofilmes em micobactérias

No âmbito do estudo realizado, pretendeu-se identificar condições que poderiam influenciar a formação de biofilmes em micobactérias. As condições em estudo foram selecionadas com base em resultados de transcritômica (*microarrays*) para os genes *Rv1358* e *sigF*, disponíveis na base de dados *TB database*<sup>56</sup> (Tabela A7.8, anexo). O meio líquido 7H9 foi suplementado com os seguintes reagentes, que foram testados em *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 e *M. bovis* BCG Tokyo: NaCl (0.9%, 1.5% e 3% (m/v)) (*Scharlau*), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM e 9 mM) (*GCL Laboratórios*; 10% (v/v)), NaNO<sub>2</sub> (5 mM, 10 mM e 25 mM) (*Merck*), MV (25 µM, 50 µM, 100 µM e 150 µM) (*Sigma-Aldrich*), ácido cítrico (5 mM e 10 mM) (*Merck*), ácido ascórbico (10 mM, 15 mM) (*VWR*), colesterol (1 mg/ml) (*Sigma-Aldrich*), NPS (25 mM e 100 mM) (*Sigma-Aldrich*). Foi caracterizado em BSL3 o crescimento dos isolados virulentos de *M. bovis* I, II, III e IV, na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NaNO<sub>2</sub>. Nos isolados de *M. bovis* I e II foram igualmente testados os efeitos da adição de colesterol e NPS. As suspensões celulares foram inoculadas com uma Abs<sub>600nm</sub> inicial de 0.05 em microplacas de 12 poços (*Corning*), incubadas a 37°C, durante sete dias no caso de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, e durante três semanas no caso de *M. bovis* BCG Tokyo e *M. bovis* I, II, III e IV. Uma vez concluído o ensaio, retirou-se 100 µl das mesmas e efetuaram-se diluições seriadas de base 10, que foram inoculadas em 7H10 como referido no ponto 3.3. Para medir a quantidade de biofilme formado, retirou-se toda a suspensão celular, lavou-se três vezes com água destilada, adicionou-se 2 ml de violeta de cristal a 1% e deixou-se a corar durante 15 min em repouso. Em seguida, removeu-se o corante e lavou-se novamente três vezes com água destilada, resuspendeu-se em 2 ml de etanol e aguardou-se 15 min, seguindo-se a leitura espectrofotométrica da Abs<sub>590 nm</sub>. Para *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 e *M. bovis* BCG Tokyo, realizou-se um mínimo de três experiências independentes e para *M. bovis* um mínimo de duas experiências independentes. A quantidade de biofilme formado foi estimada pela diferença dos valores de absorvância obtidos numa dada condição em comparação com os valores obtidos para o controlo negativo (não inoculado). Também foi calculada a percentagem de

sobrevivência das culturas, por comparação dos UFC's obtidos após crescimento numa dada condição com os valores correspondentes aos inóculos iniciais que não foram expostos aos stresses. Os inóculos iniciais tinham um valor de ordem de grandeza entre  $10^7$  e  $10^8$  UFC, que foram determinados sempre em cada ensaio ou réplica/experiência independente.

### **3.7 Análise estatística dos resultados**

Os gráficos apresentados foram desenhados com recurso ao programa GraphPad Prism® v. 5.03. Os resultados são apresentados como médias aritméticas dos valores obtidos nas várias experiências independentes e respetivo desvio padrão. Na análise estatística, foi utilizado o teste Friedman (medidas repetidas ANOVA) e o pós-teste Dunn, tendo as médias sido consideradas significativamente diferentes para  $p < 0,05$ . (em que \* significativo –  $p$  entre 0.01 e 0.05; \*\* muito significativo –  $p$  entre 0.001 e 0.01; \*\*\* extremamente significativo –  $p < 0.001$ ).

### **3.8 Estimativa do nível de expressão dos genes *Rv1358* e *sigF***

#### **3.8.1 Recolha de amostras celulares de *Mycobacterium bovis* I e II**

As culturas de *M. bovis* foram inoculadas em 10 ml de meio líquido 7H9 em frascos de cultura celular de poliestireno de 50 ml (*Nunc*™). Após atingir-se uma  $Abs_{600nm}$  de 0.3, sujeitaram-se as células ao stress selecionado pela adição do composto correspondente na concentração escolhida; incubou-se a 37°C durante 48h, recolheu-se a cultura por centrifugação. Os stresses selecionados foram: 9mM de  $H_2O_2$ , 25 mM de  $NaNO_2$ , 150  $\mu$ M de MV, 15 mM de ácido ascórbico, 1 mg/ml de colesterol, 10 mM de ácido cítrico, 25 mM e 100 mM de NPS e 3% de NaCl. Centrifugou-se a suspensão celular a 12000 rpm durante 10 min a 4°C. Removeu-se o sobrenadante, adicionou-se 750  $\mu$ l de TRIzol® (*Life technologies*) e ressuspendeu-se e guardou-se a -70 °C.

#### **3.8.2 Extração, verificação de integridade e quantificação de RNA**

Realizou-se a lise mecânica por *bead-beating* no equipamento *FastPrep FP120 Bio101* (*Savant Instruments*), durante 45 s a 6.5 velocidades (duas vezes). O restante processo de extração do RNA foi efetuado segundo o protocolo descrito pelo fabricante do TRIzol® (*Life technologies*). Verificou-se a integridade do RNA por eletroforese (80 V, 1h) em gel de agarose (*Nzytech*) a 1% (m/v), usando tampão TBE 1× (composição disponível na Tabela A.7.6) suplementado com 200  $\mu$ l de dietilpirocarbonato (DEPC) (*Sigma-Aldrich*) para inibição de RNases. A quantificação do RNA foi efetuada com recurso ao equipamento *Nanodrop* e por fluorimetria com o sistema comercial *Qubit™ Assays* e o equipamento *Qubit™ Fluorometric Quantitation* da *Life Technologies*. Após a quantificação da concentração da solução de RNA, submeteu-se esta a uma digestão com a enzima DNase, durante 1h a 37°C. Depois, inativou-se a enzima por adição de 5 mM de EDTA e incubou-se 10 min a 75°C. Considerando a concentração de RNA de cada amostra, estimou-se o volume necessário para ter 20 ng de RNA por reação de qPCR.

### 3.8.3 Quantificação relativa da expressão genética do gene *Rv1358* e *sigF* por RT-qPCR

Com a finalidade de se avaliar a expressão dos genes *Rv1358* e *sigF*, realizou-se a quantificação relativa, normalizando-se os seus níveis de expressão em relação à expressão do gene *rRNA 16S* em cada condição estudada, usando PCR em tempo real (qPCR), via transcriptase reversa (RT). Os *primers* específicos foram desenhados para a extremidade 3' dos genes alvo no programa Primer3 v.0.4.0. As informações relativas à região alvo dos genes, bem como as condições de hibridação dos *primers* estão descritas em anexo na Tabela A7.2. Efetuou-se inicialmente a otimização das condições de amplificação, nomeadamente para aferir a temperatura de hibridação dos *primers* e concentração de magnésio nas reações. Para visualização do produto de amplificação, foi efetuada uma eletroforese (80V, 1h) em gel de agarose a 3% (m/v) (resultados não mostrados). De seguida, e ainda com o objetivo de otimização das reações, transferiram-se os ensaios para o sistema de PCR em tempo real, usando DNA de *M. tuberculosis* H37Rv. Visualizou-se o produto do PCR em gel, procedendo-se como já indicado neste ponto. Após a otimização das condições de PCR, realizou-se RT-qPCR num só passo (transcrição reversa para síntese de cDNA e amplificação por PCR em tempo real) com o sistema comercial *iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit* (Biorad). Todas as informações relativas às condições reacionais e condições de PCR encontram-se descritas na Tabela A7.3. Foram efetuadas réplicas biológicas dos ensaios de crescimento e as reações padronizadas, apresentaram uma eficiência de amplificação semelhante, o que permitiu a aplicação do método de  $\Delta\Delta CT$  para cálculo dos níveis de expressão. O  $C_t$  pode ser determinado pela interseção da linha do limiar de deteção da reação (*threshold*), com a linha de amplificação de cada amostra. Os valores de  $C_q$  ( $C_t$ ) foram registados e usados nas fórmulas:  $\Delta\Delta CT = \Delta CT_2$  (Ct gene condição testada – Ct gene *rRNA 16S* condição testada) –  $\Delta CT_1$  (Ct gene condição controlo – Ct gene *rRNA 16S* condição controlo) e  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### 3.9 Construção de um mutante de eliminação do gene *Rv1358*

Neste trabalho, procedeu-se à construção de um mutante de eliminação do gene *Rv1358*, por uma estratégia de transdução especializada. Os passos principais previstos foram: o desenho dos *primers* para construção de um substrato alélico de troca (AES do inglês *allelic exchange substrate*); a clonagem do AES em cosmídeo, a ligação a fagemídeo e o empacotamento *in vitro*, a transdução em *M. smegmatis* e transdução especializada em *M. bovis*. O último passo consiste na disrupção do gene de interesse por recombinação homóloga<sup>65</sup> (Fig. A7.9, anexo).

#### 3.9.1 Construção do comídeo pYUB854- *Rv1358*

Desenharam-se os *primers* para amplificação das regiões a montante (5') e jusante (3') de *Rv1358* no programa Primer3, inserindo-se na sequência desenhada as sequências de reconhecimento das enzimas usadas para clonar cada um dos fragmentos, especificamente a montante e a jusante da



cassete de higromicina contida no vetor. As informações relativas à região alvo do gene, bem como a temperatura de *melting* dos primers estão descritas na Tabela A7.2, enquanto as condições reacionais de PCR se encontram indicadas na Tabela A7.3. Para extração de DNA plasmídico da estirpe *E. coli*/pYUB854, inoculou-se em LB líquido suplementado com 50 mg/ml de higromicina, extraíndo-se o vetor com o sistema comercial *NZYMiniprep* (Nzytech). Seguiu-se a digestão enzimática do vetor, utilizando-se as enzimas *SpeI* e *HindIII* (NEB); incubou-se durante 1h a 37°C. Foi efetuada eletroforese em gel de agarose para excisar o fragmento de 3800 bp correspondente ao vetor pYUB854 (já sem o inserto desconhecido) e purificou-se com sistema comercial (*Gel Band Purification*, GE Healthcare). Para a clonagem, desfosforilou-se o vetor usando 1 µl de fosfatase alcalina (NEB) e 2 µl do seu tampão 10× (NEB), incubando-se durante 1h a 37°C. A inativação da enzima foi realizada com o sistema QIAquick PCR Purification (Qiagen). Seguiu-se a digestão enzimática da extremidade 5' do gene, utilizando as enzimas *SpeI* e *HindIII* e incubando-se 1h a 37°C. Extraíu-se o fragmento após eletroforese em gel de agarose e purificou-se (*Gel Band Purification*, GE Healthcare). Seguiu-se a ligação com T4 DNA ligase (NEB) durante 30 min a 20°C. Transformou-se células quimicamente competentes (*NZYStar Competent Cells*), seguindo o protocolo do fabricante (Nzytech); inoculou-se em LB sólido com 50 mg/ml de higromicina; extraiu-se o DNA plasmídico dos transformantes com *NZYMiniprep* e restringiu-se com *SpeI* e *HindIII*, seguido de eletroforese para confirmação da construção. A clonagem da extremidade 3' do gene neste vetor seguiu procedimentos idênticos, com a exceção das enzimas utilizadas para clonar a jusante da cassete de higromicina, que foram *KpnI* e *XbaI* (NEB).

### **3.9.2 Ligação entre o cosmídeo pYUB854- *Rv1358* e o fagemídeo phAE 159, transfeção e eletrotransformação de culturas de *E. coli* e de *M. smegmatis***

Para a extração de DNA da estirpe *E. coli*/phAE 159, realizou-se o crescimento em meio LB líquido com 100 mg/ml de ampicilina. A extração de DNA do fagemídeo foi realizada com o sistema comercial *QIAEX® II Gel Extraction* (Qiagen). Procedeu-se à digestão enzimática do cosmídeo e do fagemídeo com 1 µl de *PacI* (NEB), 2.5 µl de tampão CutSmart (NEB) e 0.5 µl de BSA. A desfosforilação do cosmídeo foi efetuada como indicado anteriormente. A ligação do cosmídeo ao fagemídeo foi realizada com T4 DNA ligase (NEB), para um volume final de 20 µl, durante 2h a 37°C. Foi efetuada uma eletroforese (90V, 2h) em gel de agarose (Nzytech) a 0.8% (m/v), do qual foram excisadas as bandas correspondentes à ligação. O restante protocolo foi efetuado como descrito por Bardarov *et al.* (2002)<sup>65</sup> e usando o sistema comercial *Gigapack III XL* (Agilent). Após a electroporação de células competentes de *M. smegmatis*, incubaram-se as placas inoculadas a 30°C durante sete dias para visualização e confirmação da presença de lise fágica<sup>65</sup>. O restante procedimento não se encontra descrito pois não foram obtidos eletrotransformantes verdadeiros.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Enquadramento do gene *Rv1358* no genoma dos membros do MTC, funções biológicas atribuídas à proteína *Rv1358* e presumíveis interações

A sequência de DNA codificante (CDS) correspondente ao gene *Rv1358* tem 3480 pb e inicia-se na posição 1526612 pb e termina na posição 1530091 pb do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, tendo ortólogos em *M. bovis* (*Mb1393*) e *M. leprae* (*ML1753*). Os processos biológicos atribuídos são a regulação da transcrição de DNA e a transdução intracelular de sinal<sup>50</sup>. Relativamente às funções moleculares, destaca-se a sua possível atividade como regulador transcricional<sup>51</sup>. Numa única CDS, além do domínio LuxR, existe um domínio associado à atividade de adenilato ciclase<sup>46</sup>. No locus genético onde se encontra inserida, estão também localizados os genes *Rv1354c*, *Rv1356c*, *Rv1357c*, *Rv1359* e *Rv1360*<sup>50</sup> (Fig.4.1A). Destacam-se o gene *Rv1354c*<sup>66</sup>, que codifica possivelmente para a única diguanilato ciclase identificada no genoma de *M. tuberculosis*, e o gene *Rv1357c*, que codifica uma fosfodiesterase<sup>67</sup>. As proteínas codificadas por estes genes regulam, presumivelmente, a concentração intracelular de c-di-GMP, uma molécula que atua em processos biológicos importantes como a formação de biofilmes<sup>68</sup>. O gene *Rv1356c* codifica uma proteína hipotética, enquanto o gene *Rv1359* codifica possivelmente uma proteína reguladora de transcrição, e o gene *Rv1360* origina uma possível oxidoreductase<sup>50</sup>. Da análise da sequência e do enquadramento local de *Rv1358* no genoma, esta aparenta ser uma unidade monocistônica, cuja transcrição é divergente à do gene *Rv1357c* e que está aparentemente sob a regulação de uma proteína da família de reguladores negativos *arsR*<sup>56</sup>.

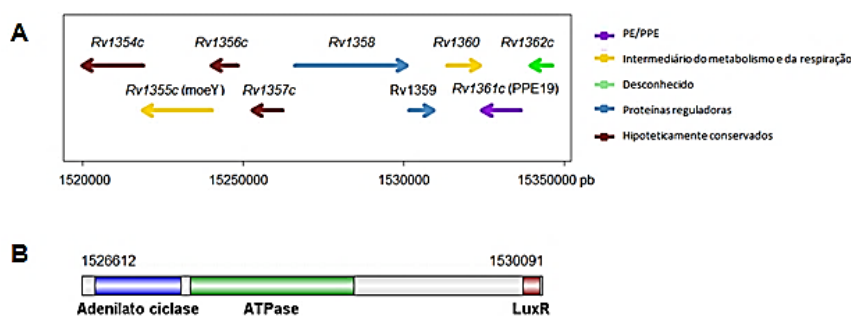


Fig.4.1–A: Locus genético onde se encontra inserido o gene *Rv1358* (adaptado de [50]). B: Representação esquemática efetuada no programa *Illustrator for Biological Sequences* (IBS), dos domínios presentes na proteína *Rv1358* com base na análise da sequência aminoacídica de *M. tuberculosis* H37Rv efetuada na base de dados CDD.

A proteína *Rv1358* possui 1159 aminoácidos (aa) e integra-se na categoria funcional de proteína reguladora de transcrição<sup>50</sup>, estando incluída na sub-família LuxR, a qual pertence à família *GerE*<sup>55</sup>. A análise dos domínios funcionais, usando a base de dados CDD sugere a presença dos seguintes domínios: na região N-terminal, adenilato ciclase de tipo III (35-251 aa); na região central um domínio ATPase (274-685 aa) e na extremidade C-terminal um domínio LuxR (1110-1154 aa) (Fig.4.1B). Na base de dados *Interpro*, os domínios previstos são os mesmos, com exceção da região central onde é identificado um domínio *P-loops* (254-519 aa). Relativamente às funções, refira-se que o domínio de adenilato ciclase está envolvido na transdução de sinais extracelulares em respostas intracelulares; no

entanto, no caso específico da proteína Rv1358 verifica-se, através da análise de perfis de modelos *Hidden Markov*, que o domínio de ciclase não apresenta a segunda ligação metálica de aspartato na posição 61 aa (substituição por serina), bem como um resíduo de asparagina característico na posição 56 aa (substituição por aspartato)<sup>69</sup>. O domínio de ATPase está envolvido na hidrólise de ATP, enquanto o domínio LuxR tem uma conformação do tipo HTH (hélice-volta-hélice) característico para ligação ao DNA. Relativamente à presença de codões *stop*, pesquisada através da ferramenta *Codon Usage* verificou-se que, em termos percentuais, a proteína Rv1358 apresenta apenas 1% de UAG. A pesquisa efetuada através da ferramenta *ExPASy* evidencia que existe apenas um codão *stop* na primeira grelha de leitura, na posição 1160; vários codões *stop* na segunda grelha de leitura, entre as posições 127 e 1140 e, na terceira grelha de leitura, entre as posições 436 e 943. Relativamente às interações moleculares previstas, tendo por base a análise realizada na base de dados *TB Database* com a sequência da estirpe H37Rv, prevê-se que a proteína Rv1358 interaja com 12 outras proteínas, destacando-se a proteína Rv3133c (*dosR*). Na base de dados *MTB Network Portal* é indicado que a proteína Rv1358 sobre-regula os *biclusters* 0085, 0091, 0235, 0346, 0374, 0507 e sub-regula o *bicluster* 0451. É também indicado que a transcrição do gene *Rv1358* é regulada por Rv0735, Rv0494, Rv0260c, Rv0330c, Rv0894, Rv1985c, Rv0042c, Rv0260c. Na base de dados *STITCH*, na estirpe CDC1551, é possível verificar interações químicas com AMP cíclico com um nível de confiança de 40%. O mesmo não se verifica em *H37Rv*. Na base de dados *STRING*, foi utilizada como referência a sequência da estirpe *H37Rv*, tendo as interações um nível de confiança entre 40 e 60%. Verifica-se que Rv1358 interage sobretudo com fatores de transcrição, incluindo *dosR* (Fig.4.2).

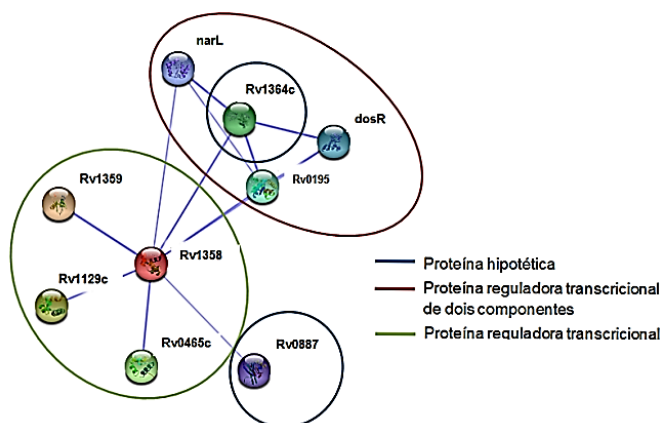


Fig. 4.2– Esquema das interações previstas *in silico* entre a proteína Rv1358 de *M. tuberculosis* H37Rv e outras proteínas/genes presentes no seu genoma.

## 4.2 Comparação de genomas do MTC por análise bioinformática do gene *Rv1358*

### 4.2.1 Análise comparativa da sequência nucleotídica do gene *Rv1358* nos genomas de bactérias do MTC

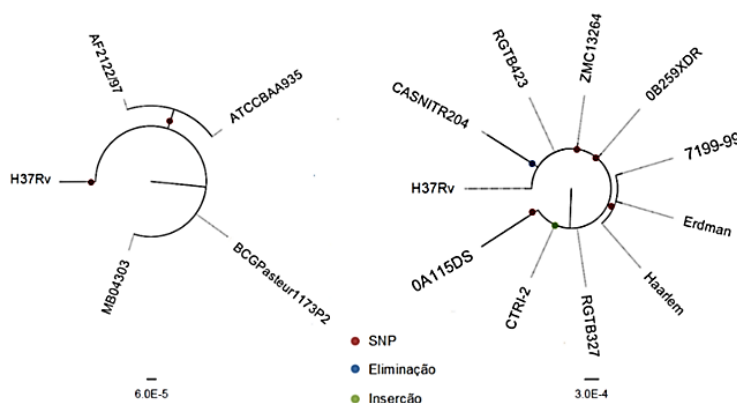
A região nucleotídica de 500 pb localizada a montante de *Rv1358* e presumivelmente contendo a sequência da região promotora foi analisada e comparada em 26 genomas de *M. bovis* e 52 genomas

de *M. tuberculosis*, tendo-se verificado elevado grau de conservação (dados não mostrados). No que respeita à região codificante, nas 26 sequências de *M. bovis* analisadas registou-se a presença de três SNP's em relação à sequência de referência da estirpe H37Rv: c.92T>G (presente apenas em *M. bovis* AF2122-97 e *M. bovis* ATCC BAA-935), c.208C>A e c.1325A>C. Para *M. tuberculosis*, detetaram-se 19 polimorfismos entre as 52 sequências estudadas. O domínio mais afetado é o domínio ATPase, representando 46,25% dos polimorfismos, seguido do domínio de adenilato ciclase com 38,75%, e por último o domínio LuxR com 3,25% dos polimorfismos encontrados (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1 - Comparação de sequências nucleotídicas de estirpes de *M. bovis* e *M. tuberculosis* para o gene *Rv1358*, usando como referência o genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, com anotação dos polimorfismos encontrados.**

Posição e Base Alterada	Domínio afetado	Nº de estirpes estudadas (espécie)	Nº de estirpes afetadas	Exemplo de uma estirpe afetada
c.208C>A	Ciclase	26 ( <i>M. bovis</i> )	26	<i>M. bovis</i> 04-303 MB04303
c.390insA	Ciclase	52 ( <i>M. tuberculosis</i> )	1	<i>M. tuberculosis</i> RGTB423
c.841insT	ATPase	52 ( <i>M. tuberculosis</i> )	4	<i>M. tuberculosis</i> CTRI-2
c.1325A>C	ATPase	26 ( <i>M. bovis</i> )	26	<i>M. bovis</i> AF2122-97
c.3039-3049del	LuxR	52 ( <i>M. tuberculosis</i> )	1	<i>M. tuberculosis</i> CAS-NITR204
c.3345G>A	LuxR	52 ( <i>M. tuberculosis</i> )	3	<i>M. tuberculosis</i> Erdman/ATCC 35801

Após esta análise, averiguou-se a influência dos polimorfismos encontrados no gene *Rv1358* nas relações microevolutivas dos 14 genomas analisados, esboçando-se um cladograma (Fig.4.3). Os resultados obtidos sugerem diferentes padrões microevolutivos em *M. bovis* e *M. tuberculosis* que possivelmente refletem a adaptação específica dos agentes etiológicos aos respetivos hospedeiros. Comparativamente, as estirpes de *M. tuberculosis* apresentam um maior grau de variação do que as estirpes de *M. bovis*. Os resultados relativos a *M. bovis* sugerem uma pressão seletiva para a conservação da sequência do gene *Rv1358*. Em *M. tuberculosis*, devido à presença de vários polimorfismos que podem conduzir a uma proteína não funcional, pode ser sugerido um cenário de pseudogenização. Existem alterações da grelha de leitura nas posições: 390 pb na estirpe *M. tuberculosis* RGTB423, na posição 841 pb nas estirpes *M. tuberculosis* RGTB327, UT205, F11 e CTRI-2.



**Fig. 4.3– Cladograma dos isolados de *M. bovis* (à esquerda) e *M. tuberculosis* (à direita) analisados, evidenciando os eventos microevolutivos do gene *Rv1358*, com base nos polimorfismos identificados e assinalando-se a vermelho os SNPs, a azul as eliminações e a verde as inserções.**

#### 4.2.2 Análise de polimorfismos no gene *Rv1358* em estirpes clínicas de *M. tuberculosis* que circulam a nível mundial

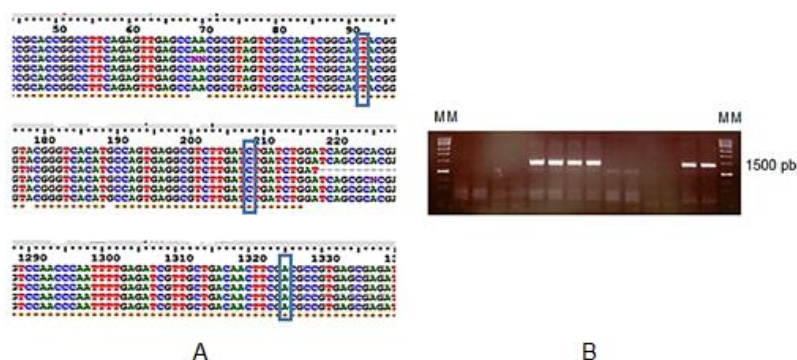
Para complementar o estudo efetuado, analisaram-se ainda os polimorfismos presentes em sequências nucleotídicas de isolados clínicos de *M. tuberculosis*, oriundos de vários países e cujos genomas se encontram depositados na base de dados *PolyTB* (e ausentes do *NCBI*). A Tabela 4.2 compila os polimorfismos encontrados com maior frequência (acima de 0.001).

**Tabela 4.2– Anotação dos polimorfismos identificados em 341 sequências nucleotídicas do gene *Rv1358* a partir da análise de genomas de *Mycobacterium tuberculosis* depositadas na base de dados *PolyTB*.**

Posição alterada	Base alterada	Codão alterado	Tipo de alteração	Linhagem filogenética de <i>M. tuberculosis</i>	População	Domínio afetado	Frequência (considerando o total de estirpes analisadas)
1526735	A->G	ATC->GTC	Não Sinónima (I->V)	linhagem 2 Beijing	China	Ciclase	0.006
1526819	C->A	CGG->AGG	Sinónima (R->R)	linhagem 4 T1 e linhagem 4 H3	China, Gana, Holanda, Portugal e USA	Ciclase	0.16
1527376	G->C	ATC->ATG	Não Sinónima (M->I)	linhagem 5 AFRI 3	Gana	ATPase	0.05
1527712	C->T	GAC->GAT	Sinónima (D->D)	linhagem 4 X2	USA	ATPase	0.003
1529942	G->T	GTC->TTC	Não Sinónima (V->I)	linhagem 1 EAI5	Gana	LuxR	0.003
1529952	G->A	GGA->GAA	Não Sinónima (G->E)	linhagem 4 T2 e linhagem 4 T1	Holanda, Portugal e USA	LuxR	0.06

#### 4.2.3 Verificação da existência de polimorfismos no gene *Rv1358* em isolados de campo de *M. bovis*

Pesquisou-se a existência de polimorfismos no gene *Rv1358* em seis isolados de campo de *M. bovis*. Procedeu-se à amplificação de uma região de 648 pb e 1233 pb correspondente aos domínios de adenilato ciclase e de ATPase. No isolado 6086, apenas se obteve amplificação para a região correspondente ao domínio da adenilato ciclase. Verificou-se que as amostras de campo não apresentam quaisquer dos polimorfismos encontrados nos genomas de *M. bovis* depositados no *Genbank*, sendo as sequências de *Rv1358* idênticas à do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv depositado na base de dados *NCBI* (Fig.4.4).



**Fig. 4.4– A:** Alinhamentos das sequências dos fragmentos de *Rv1358* amplificados a partir do genoma dos isolados de campo de *M. bovis* para averiguação da presença dos polimorfismos nucleotídicos identificados por análise bioinformática de estirpes de *M. bovis*, que se

encontram assinalados nas caixas azuis. B: Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação de um fragmento do gene *Rv1358* obtidos por PCR. MM: Marcador de massas moleculares HyperLadder III (Bioline).

#### 4.3 Análise comparativa de sequências aminoacídicas da proteína Rv1358 em isolados clínicos do MTC para averiguação da presença de SNPs

A análise comparativa de sequências aminoacídicas da proteína Rv1358 em 56 isolados clínicos do MTC permitiu a identificação de 50 polimorfismos. Foram apenas identificados SNPs. Cerca de metade dos polimorfismos registados não afeta qualquer domínio funcional. O domínio mais afetado é o de ATPase, com uma frequência de 32,3%, enquanto 10,3% dos polimorfismos registados correspondem a alterações nos domínios de adenilato ciclase ou LuxR (Tabela 4.3). A maioria das alterações detetadas é não conservativa, levando em alguns casos, à disrupção precoce da grelha de leitura, podendo a proteína apresentar 1105 aa, 1110 aa, 1115 aa ou 1124 aa.

**Tabela 4.3- Comparação de 56 sequências da proteína Rv1358 obtidas de genomas do complexo *M. tuberculosis*, com anotação dos polimorfismos encontrados na base de dados *NCBI*.**

Posição e Aminoácido alterado	Tipo de alteração	Domínio afetado	Nº de estirpes do MTC estudadas	Nº de estirpes afetadas (espécie afetada)	Exemplo de uma estirpe afetada
442_D>A	Não conservativa	ATPase	56	3 ( <i>M. bovis</i> , n=3)	<i>M. bovis</i> AF2122/ 97
705_P>L	Não conservativa	Nenhum	56	3 ( <i>M. canettii</i> , n=3)	<i>M. canettii</i> CIPT 140010059
912_A>V	Semi-conservativa	Nenhum	56	3 ( <i>M. africanum</i> , n=3)	<i>M. africanum</i> GM 41182
1112_G>E	Não conservativa	LuxR	56	6 ( <i>M. tuberculosis</i> , n=47)	<i>M. tuberculosis</i> 1755BN

#### 4.4 Previsão *in silico* da estrutura terciária da proteína Rv1358

A modelação da estrutura tridimensional da proteína Rv1358 foi efetuada por homologia usando como base a sequência aminoacídica de referência da estirpe H37Rv, tendo 85% dos resíduos sido modelados com mais de 90% de confiança (Fig.4.5A). Foram também modeladas as estruturas tridimensionais das proteínas de uma estirpe de *M. bovis* e de uma estirpe de *M. tuberculosis* que apresentam polimorfismos nos domínios de ATPase e de LuxR respetivamente (Fig.4.5B e 4.5C). Nesta análise verifica-se que no domínio de ATPase, a mudança de aspartato para alanina, que corresponde à remoção de um resíduo ácido para um hidrofóbico, modifica a carga da cadeia lateral, ficando o domínio menos exposto para interagir com substratos; no domínio LuxR, a mudança de glicina para glutamato leva à adição de carga negativa e exerce um efeito de polaridade, expondo mais o domínio, pelo que se presume que este será capaz de interagir mais facilmente com os respetivos ligandos. Foram também detetadas alterações das sequências nucleotídicas de *Rv1358*, com oito sequências alteradas (uma estirpe de *M. bovis* e sete estirpes de *M. tuberculosis*), que levam à disrupção da grelha de leitura e interrupção precoce da tradução da proteína codificada.

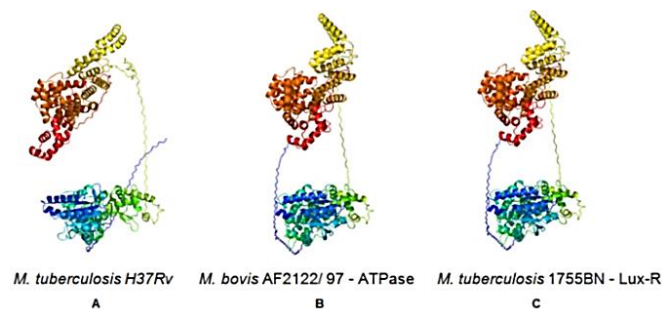


Fig. 4.5– Modelos tridimensionais obtidos por pesquisa de homologia na base de dados Phyre das sequências aminoácidas da proteína Rv1358 (A) e da proteína Rv1358 com mutações nos domínios ATPase (B) e LuxR (C). As extremidades e os diferentes domínios encontram-se representados a cores: extremidades N terminal (violeta) e C terminal (vermelho); domínio de ciclase (azul/verde), de ATPase (amarelo/laranja), e de LuxR (vermelho).

#### 4.5 Avaliação da resposta fisiológica de micobactérias selecionadas a condições de stresse ambiental que mimetizam o ambiente do hospedeiro: efeito na formação de biofilmes

##### 4.5.1 Avaliação do efeito do peróxido de hidrogénio, do metil de viologénio, do ácido cítrico e do ácido ascórbico, no crescimento de *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo

As condições de stresse testadas permitem mimetizar *in vitro* um ambiente similar ao do hospedeiro, possibilitando avaliar a resposta fisiológica das micobactérias. Nos ensaios realizados não foi usada agitação e não foi usado Tween® 80, pois é um dispersante e não favorece a agregação das células<sup>71,72,73</sup>. Neste trabalho, utilizou-se um ensaio de avaliação da formação de biofilmes que prevê o crescimento dos microrganismos em suspensão no interior de microplacas (ensaio de O'Toole e colaboradores<sup>74</sup>). Para *M. smegmatis*, na presença de 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abs<sub>590</sub> de 0.43) observaram-se diferenças extremamente significativas ( $p < 0.001$ ) (Fig. 4.6B), com uma sobrevivência que baixa drasticamente de 97% para 35%. No caso de *M. bovis* BCG Tokyo, com a adição de 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a quantidade de células aderidas aos poços da microplaca apresenta diferenças extremamente significativas ( $p < 0.001$ ) comparativamente ao controlo (Abs<sub>590</sub> de 0.47, face a 1.2 no controlo), o que também é reflexo da diminuição da sobrevivência (redução de 96% para 39%) (Fig. 4.6B). Estudos anteriores mostraram que a presença de concentrações baixas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.05 e 0.5 mM) induz a sobre-regulação de genes envolvidos na resposta ao stresse, tais como *katG* (catalase) e que ocorre igualmente a diminuição da viabilidade da cultura em *M. tuberculosis*, o que é consistente com os nossos resultados<sup>75</sup>. Testou-se ainda o efeito do metil de viologénio (MV), composto que converte o dióxigénio (O<sub>2</sub>) em anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)<sup>76</sup>. Foi possível observar a formação de uma película firme na parte superior do poço (Fig.4.6A). Para *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo, a presença 150 µM de MV no meio induziu diferenças extremamente significativas ( $p < 0.001$ ) na quantidade de células agregadas e na sobrevivência (Fig. 4.9B). Com a adição de ácido cítrico e ácido ascórbico, observa-se a formação preferencial de biofilme na parte inferior dos poços. (Fig.4.9A). Tanto para *M. smegmatis* como para *M. bovis* BCG Tokyo, a adição de 10 mM de ácido cítrico leva a diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) dos valores médios obtidos (Fig. 4.6B). O ácido cítrico integra o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, essencial ao



metabolismo das micobactérias<sup>77,78</sup>. Já foi descrito que *M. tuberculosis* adapta-se à hipóxia, atrasando e remodelando o seu ciclo TCA<sup>79</sup>. Na presença de 15 mM de ácido ascórbico no meio, ocorrem diferenças extremamente significativas ( $p<0.001$ ) em *M. smegmatis*, onde se regista uma diminuição do biofilme formado (Abs<sub>590</sub> de 0.465, face a 1.56 no controlo) e em *M. bovis* BCG Tokyo uma diminuição de Abs<sub>590</sub> de 1.54 (controlo) para 0.499 (Fig. 4.6B), bem como da sobrevivência. Pensa-se que o ácido ascórbico desencadeia um fenótipo de dormência das micobactérias, pois ao eliminar o O<sub>2</sub> do meio, induz hipóxia e ativa a expressão do regulão DosR. Em estudos anteriores, já foi verificada a inibição do crescimento na presença de ácido ascórbico (10 mM)<sup>80</sup>, o que está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho.

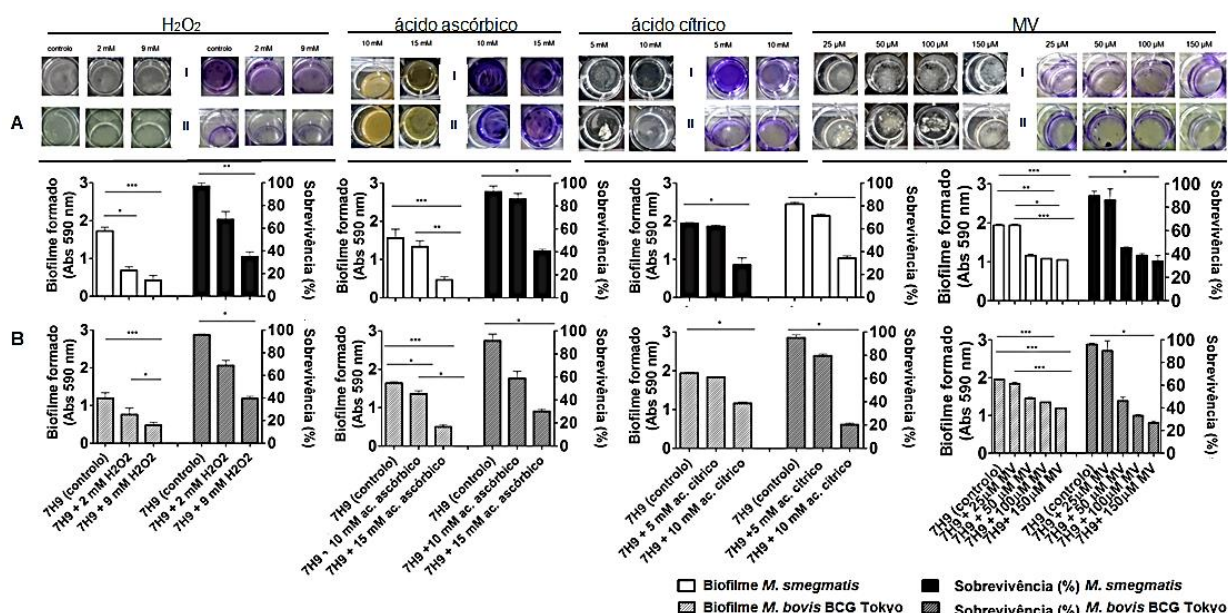


Fig. 4.6—A: Representação do crescimento em microplaca (à esquerda) com o peróxido de hidrogénio, ácido ascórbico, ácido cítrico e metil de viologénio e após o tratamento com o corante violeta de cristal (à direita), onde I representa *M. smegmatis* e II representa *M. bovis* BCG Tokyo. B: Quantificação da quantidade de biofilme formado e da sobrevivência de *M. smegmatis* (após uma semana) e *M. bovis* BCG Tokyo (após três semanas) na presença de peróxido de hidrogénio (2mM e 9 mM), ácido ascórbico (10 mM e 15 mM), ácido cítrico (5 mM e 10 mM) e metil de viologénio (25 μM, 50 μM, 100 μM e 150 μM).

#### 4.5.2 Avaliação do efeito de nitrato de sódio e nitroprussiato de sódio no crescimento de *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo em biofilmes

Os compostos nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>) e nitroprussiato de sódio (NPS) estão envolvidos na produção de RNIs. Na presença destes dois compostos, observou-se a formação de agregados de células à superfície dos poços (Fig.4.7B). Em *M. smegmatis*, comparando a formação de biofilme na condição controlo (7H9) e na presença de 25 mM de NaNO<sub>3</sub> registaram-se diferenças extremamente significativas ( $p<0.001$ ) nos valores médios de Abs<sub>590</sub> (redução para 0.24). Para *M. bovis* BCG Tokyo, a presença de 25 mM NaNO<sub>3</sub> no meio apresenta diferenças extremamente significativas ( $p<0.001$ ) (redução de Abs<sub>590</sub> de 1.29 no controlo para 0.26) (Fig.4.7A). O NaNO<sub>3</sub> protona para formar HNO<sub>3</sub> e produz RNIs<sup>81,82</sup>. Está descrito em *Mycobacterium* spp. que a exposição a concentrações superiores a 6 mM, exercem um efeito bactericida<sup>83</sup>, o que está de acordo com os resultados obtidos. No caso do



NPS, concluiu-se que existem diferenças de crescimento a partir de 25 mM, e que na presença de 100 mM, há pouco crescimento visível, sendo estas as concentrações testadas no estudo posterior (Fig.4.7C). Em *M. smegmatis*, comparando a formação de biofilme no controle (7H9) e a presença de 25 mM de NPS, existem diferenças extremamente significativas ( $p < 0.001$ ) nos valores médios de Abs<sub>590</sub> (com um valor de 1.25 no controle, face a 2.4 na presença de 25 mM de NPS), com diminuição da taxa de sobrevivência de 80% para 31%. Para *M. bovis* BCG Tokyo, a presença de 25 mM NPS no meio apresenta diferenças extremamente significativas (com um valor de Abs<sub>590</sub> de 1.3 no controle, face a 2.9, com uma redução abrupta do valor da taxa de 85% para 37%. (Fig.4.7A). O NPS tem um grupo nitrosil ligado ao ferro num complexo bipiramidal. O NO pode ser reduzido a NO<sup>-</sup> por Fe (II) em solução acídica, enquanto o ião de nitroxilo (NO<sup>-</sup>) pode ser oxidado a NO por ião ferricianeto<sup>84</sup>.

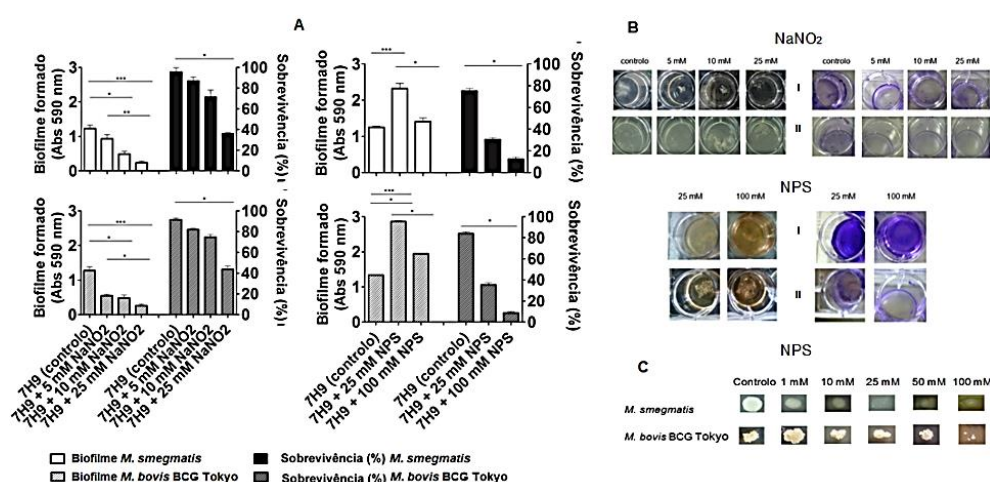


Fig. 4.7- A: Quantificação e comparação de biofilme formado e da taxa de sobrevivência de *M. smegmatis* (após uma semana) e *M. bovis* BCG Tokyo (após três semanas) quando cultivado na presença de nitrito de sódio (5mM, 10 mM e 25 mM) e nitroprussiato de sódio (25 mM e 100 mM). B: Representação do crescimento em microplaca (à esquerda) com o nitrito de sódio e nitroprussiato de sódio e após o tratamento com o corante violeta de cristal (à direita), onde I representa *M. smegmatis* e II representa *M. bovis* BCG Tokyo. C - Determinação da concentração sub-inibitória de NPS nas estirpes *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo.

#### 4.5.3 Avaliação do efeito do colesterol no crescimento de *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo em biofilmes

Um estudo anterior mostra que o gene *fadA5* (envolvido na degradação de lípidos) se encontra sobre-expresso quando *M. tuberculosis* é crescido em linhas celulares de macrófagos e em descontinuo na presença de colesterol<sup>70</sup>. Os níveis séricos elevados de colesterol no hospedeiro, parecem estar envolvidos na infecção por micobactérias, pois ocorre o aumento da carga micobacteriana no pulmão ou em outros órgãos, dificultando o combate à infecção pelo sistema imunitário<sup>23</sup>. Além disso, estudos anteriores também sugerem um papel do colesterol no metabolismo de *M. tuberculosis*, permitindo a sua persistência<sup>85</sup>. O controle utilizado neste ensaio foi o meio 7H9 com a adição de Tween® 80 1%. As diferenças registadas poderão dever-se à presença de Tween® 80 1% no meio e não devido à presença específica do colesterol, não se verificando diferenças significativas dos valores médios de biofilme formado (Abs<sub>590</sub>).

#### 4.5.4 Efeito da presença de cloreto de sódio no crescimento de *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo em biofilmes

As flutuações osmóticas alteram a pressão de turgescência, o que pode prejudicar a atividade metabólica microbiana. As bactérias neutralizam estas flutuações através da acumulação ou eliminação de solutos compatíveis que restabelecem o equilíbrio osmótico à célula. A resposta de *M. tuberculosis* ao stresse osmótico, ocorre em parte, através de uma via que inclui um osmosensor, onde a atividade é regulada por *sigF*<sup>86</sup>. Já foi verificado em *Staphylococcus aureus* que concentrações de NaCl entre 1.6% e 4.8% estimulam a produção de biofilme<sup>87</sup>. Neste trabalho, verificaram-se diferenças extremamente significativas ( $p < 0.001$ ), com redução marcada na quantidade de biofilme e sobrevivência, na presença de 3% de NaCl no meio, de *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo.

#### 4.6 Avaliação da resposta fisiológica de estirpes virulentas de *M. bovis* a condições de stresse ambiental previamente estabelecidas que mimetizam o ambiente do hospedeiro: efeito no crescimento celular em descontínuo e na formação de biofilmes

##### 4.6.1 Efeito da presença de colesterol e de stresse oxidativo ou nitrosativo no crescimento celular em descontínuo

Nestes ensaios foram testadas quatro estirpes de campo de *M. bovis*. No estudo do efeito dos stresses no crescimento celular em descontínuo, foi estudada apenas uma estirpe virulenta, *M. bovis* II. Comparativamente ao controlo (que atinge um valor máximo de Abs<sub>600</sub> de 1.78), a incubação com ácido ascórbico promove o metabolismo, atingindo um valor de biomassa final (Abs<sub>600</sub>) de 2.21, superior ao controlo (Fig.4.8A). Estes resultados contrariam dados publicados que descrevem a inibição do crescimento de *M. tuberculosis* na presença de ácido ascórbico<sup>79</sup>. Com a presença de MV no meio, foi possível verificar que ocorre o pico de crescimento por volta das 100h (com valor de Abs<sub>600</sub> de 1.49), seguido de uma diminuição da biomassa. Na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, verifica-se um valor de Abs<sub>600</sub> final de 1.02, na presença de NPS, regista-se um valor de Abs<sub>600</sub> de 0.78 e na presença de NaNO<sub>2</sub> um valor de Abs<sub>600</sub> de 1.05. Relativamente à adição de colesterol ao meio, este tem um valor de biomassa final de 2.05. Quanto à viabilidade, a presença de ácido ascórbico conduz a uma concentração de células viáveis de 10<sup>13</sup> versus 10<sup>12</sup> UFCs/ml do controlo (Fig.4.8B), e a uma taxa de crescimento de 0.0500 h<sup>-1</sup> versus 0.0189 h<sup>-1</sup> no controlo (Fig.4.8C).

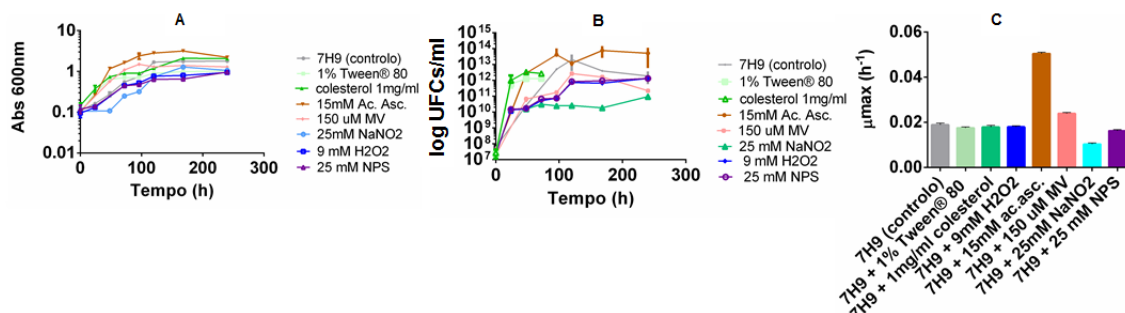


Fig. 4.8- Parâmetros de crescimento obtidos para *M. bovis* II durante o crescimento celular em descontínuo, em frascos de cultura celular contendo 7H9 (controlo) ou 7H9 modificado pela adição de Tween® 80, colesterol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ácido ascórbico, de MV, de NaNO<sub>2</sub> ou NPS. A- Abs<sub>600nm</sub> vs tempo; B- Concentração de células viáveis (log UFCs/ml) vs tempo. C - Taxa específica de crescimento (μmax (h<sup>-1</sup>)).

#### 4.6.2 Efeito da presença de colesterol e dos stresses oxidativo e nitrosativo na formação de biofilmes

Em seguida, estão representados os dados do biofilme formado (Abs<sub>590</sub>) e das taxas de sobrevivência para as condições de stresse testadas nas estirpes virulentas de *M. bovis*. Nestes ensaios, a presença de 9 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio provoca uma diminuição no biofilme formado, com diferenças extremamente significativas (p<0.001) em todas as estirpes estudadas. Os resultados obtidos são consistentes com os resultados de outros estudos, onde se demonstra que concentrações superiores a 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio diminuem a viabilidade da cultura<sup>75</sup>. Relativamente ao composto NaNO<sub>2</sub>, a presença de 25 mM, provoca diferenças extremamente significativas (p<0.001) em todas as estirpes analisadas (Fig4.9A). Nestes ensaios, verifica-se que a presença de NaNO<sub>2</sub> no meio leva à diminuição da viabilidade, o que está de acordo com estudos anteriores<sup>83</sup>. Tendo em conta a semelhança dos resultados obtidos dentro do mesmo spoligotipo, os restantes stresses só foram testados em *M. bovis* I e II. Relativamente ao colesterol, para *M. bovis* I, a comparação dos valores de Abs<sub>590</sub>, entre o controlo e 7H9 suplementado com colesterol, o valor diminui de 0.58 (controlo) para 0.57 (Fig4.9A). Nas estirpes *M. bovis* I e II, na presença de NPS verifica-se a formação de agregados de células à superfície dos poços (Fig4.9B). Em termos de biofilme formado (Abs<sub>590</sub>), a presença de 25 mM de NPS, provoca diferenças extremamente significativas (p<0.001) em *M. bovis* I e II. (Fig.4.9A).

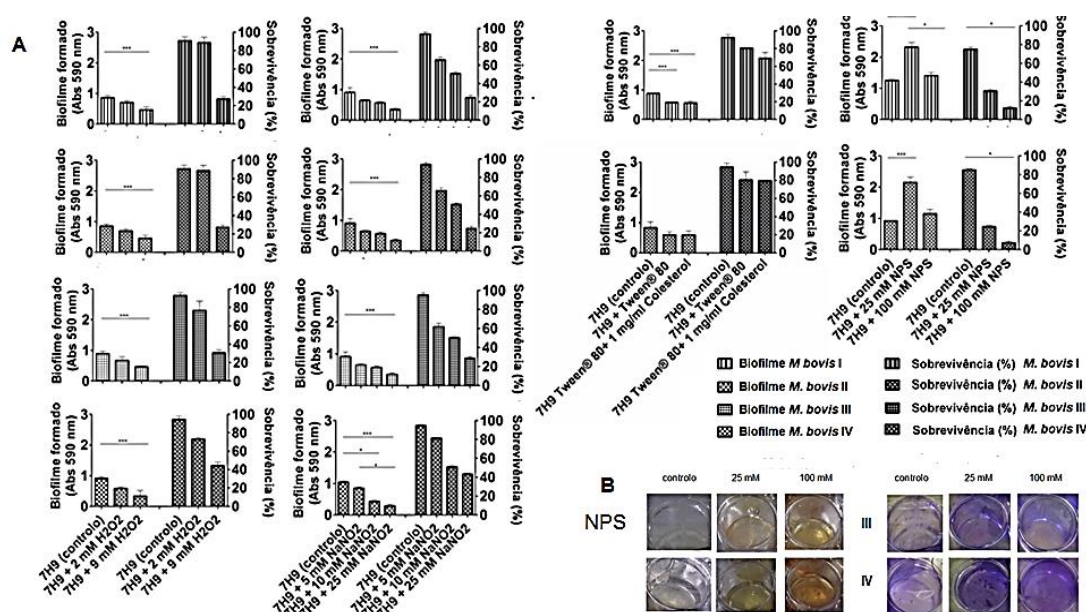


Fig. 4.9- A: Quantificação e comparação da quantidade de biofilme formado e da sobrevivência de *M. bovis* I, II, III e IV (após três semanas) na presença de peróxido de hidrogénio (2 mM e 9 mM), nitrito de sódio (5 mM, 10 mM e 25 mM), colesterol (1 mg/ml) e nitroprussiato de sódio (25 mM e 100 mM). B: Representação do crescimento em microplaca (à esquerda) com nitroprussiato de sódio e após o tratamento com o corante violeta de cristal (à direita), onde III representa *M. bovis* I e IV representa *M. bovis* II.

#### 4.6.3 Relação entre a quantidade de biofilme formado e a sobrevivência das micobactérias seleccionadas na presença de variados stresses ambientais

Para avaliar uma possível associação entre as variáveis estudadas e avaliar a linearidade dos resultados, efetuou-se uma análise de regressão linear e utilizou-se o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) (Fig.A.7.10A e A.7.10B, em anexo). Esta análise sugere que, no geral, a relação entre a sobrevivência e a formação de biofilmes é linear, indicando que maiores taxas de sobrevivência estão associadas a uma maior quantidade de biofilme. Nos casos em que o valor do coeficiente de determinação é baixo, a distribuição dos dados não é linear, deduzindo-se que a regressão não explica a variabilidade dos dados obtidos (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4– Tabela com os coeficientes de determinação das condições estudadas em cada estirpe.**

	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2 mM e 9 mM)	NaNO <sub>2</sub> (5 mM, 10 mM e 25 mM)	NPS (25 mM e 100 mM)	Colesterol (1 mg/ml)	MV (25 µM, 50 µM, 100 µM e 150 µM)	ácido cítrico (5 mM e 10 mM)	NaCl (0.9%, 1.5% e 3%)	ácido ascórbico (10 mM e 15 mM)
	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>
<i>M.smegmatis</i>	0.8925	0.8558	0.1447	0.9238	0.9868	0.9623	0.9889	0.9136
<i>M.bovis</i> BCG Tokyo	0.9131	0.6103	0.2657	0.073	0.9806	0.9911	0.9774	0.9005
<i>M.bovis</i> I	0.8563	0.9251	0.2444	0.7129	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>M.bovis</i> II	0.9583	0.9272	0.1619	0.1953	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>M.bovis</i> III	0.8941	0.9236	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>M.bovis</i> IV	0.9589	0.9948	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A- não aplicável (condição não testada)

#### 4.7 Determinação do perfil transcricional dos genes *Rv1358* e *sigF* durante o crescimento em descontínuo de *Mycobacterium bovis* nas condições de stresse estabelecidas

Dada a semelhança do comportamento dos isolados de *M. bovis*, foram selecionadas apenas duas estirpes, *M. bovis* I e *M. bovis* II, para a análise da expressão gênica. Além do gene *Rv1358*, também foi estudada a transcrição do gene *sigF*, devido à existência de regiões consenso características de *sigF* na região a montante da CDS de *Rv1358*, pelo que especulamos que este fator sigma possa ser alternativamente recrutado pela RNA polimerase para a transcrição do gene *Rv1358*. A fim de se avaliar se o nível de expressão destes genes é afetado pelas condições de crescimento, foram efetuados ensaios de RT-qPCR para medir indiretamente os níveis de mRNA destes genes em 7H9 e em 7H9 modificado. Após crescimento das micobactérias e extração do RNA total das suspensões celulares, verificou-se a integridade do RNA extraído em gel de agarose, onde se pode observar a presença das bandas correspondentes aos genes *rRNA 16S* e *rRNA 23S* (Fig.4.10A). Após obter-se amplificação dos fragmentos das extremidades 3' dos genes em análise por PCR convencional, para otimização das condições reacionais, avançou-se para o processo de otimização do PCR em tempo real (capítulo 3.8.5). A reação de padronização inicial mostrou a amplificação de um único fragmento em todos os genes com a temperatura de *melting* (dissociação) esperada (Fig.4.10B). Relativamente ao RT-qPCR, as amplificações ocorreram em média no ciclo 10 para o gene *rRNA 16S*, no ciclo 20 para o gene *Rv1358* e o no ciclo 22 para o gene *sigF*. A temperatura de *melting* para o gene *Rv1358* é de 84.5°C, para o gene *sigF* é de 84.5°C e para o gene *rRNA 16S* é de 85°C (Fig.4.10C).

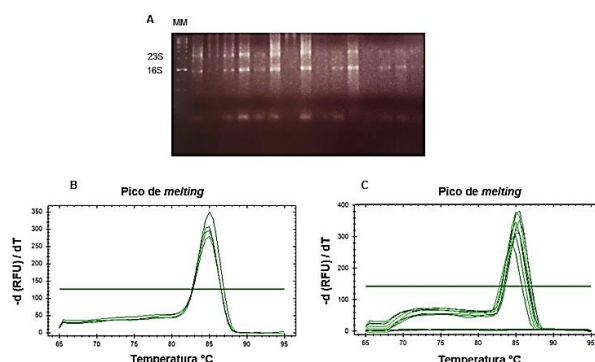


Fig. 4.10- A: Eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v) de amostras de RNA, para verificar a sua integridade. MM: Marcador de massas moleculares HyperLadder III (Bioline). B: Exemplo de curva de dissociação (*melting curve*) do teste de otimização de PCR em tempo real efetuado com DNA, para o gene *Rv1358*. C: Exemplo de curva de dissociação (*melting curve*) de condições em estudo, para o gene *Rv1358*.

O nível de expressão do gene *Rv1358* para cada condição de stresse foi obtido após normalização com o nível de expressão do gene de referência *rRNA 16S*. Relativamente à expressão de *Rv1358* e *sigF*, verifica-se uma sub-expressão de ambos os genes em todas as condições ambientais de stresse estudadas, com exceção do ácido ascórbico (Fig.4.11). Os resultados obtidos estão de acordo com os resultados de *microarrays* descritos na literatura, apesar de terem sido obtidos valores superiores de inibição da transcrição. A diminuição da expressão genética é mais acentuada no gene *sigF* nas condições MV, ácido ascórbico e NaCl (em *M. bovis* II). A condição do colesterol para o gene *Rv1358* é uma exceção, pois a expressão deveria estar aumentada, de acordo com dados de expressão publicados na literatura, mas apresenta-se diminuída. Esta diferença deve-se possivelmente ao tempo de exposição ao composto, que foi apenas de 24 horas, e ao facto da micobactéria estudada na literatura ser *M. tuberculosis*<sup>85</sup>. Para o ácido cítrico, ácido ascórbico, MV e NPS não haviam dados na literatura relativos à expressão genética de *M. tuberculosis* ou *M. bovis* na presença destes compostos, sendo os resultados apresentados no presente trabalho descritos pela primeira vez. Ainda é possível verificar que a expressão relativa aos genes varia de estirpe para estirpe de *M. bovis*, como se regista na presença de ácido ascórbico, em que a expressão de *Rv1358* e *sigF* em *M. bovis* I se encontra aumentada nove e oito vezes respetivamente; em contraste, nestas condições, a expressão dos mesmos genes encontra-se diminuída seis e 30 vezes, respetivamente, em *M. bovis* II.

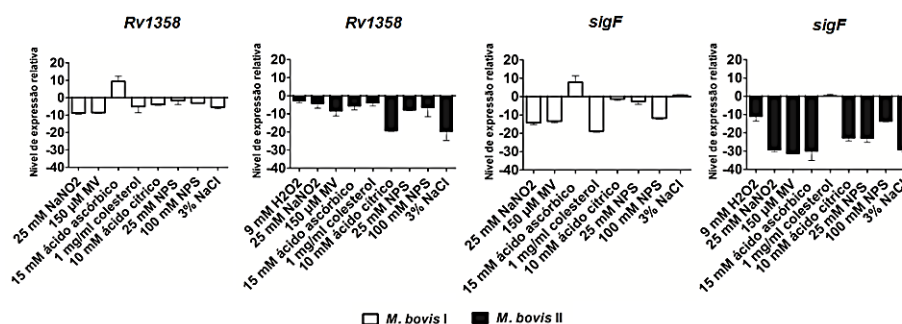


Fig.4.11– Expressão genética dos genes *Rv1358* e *sigF*, na presença dos múltiplos stresses determinados por RT-qPCR (nas estirpes *M. bovis* I e II). O nível de expressão do gene *Rv1358* para cada condição de stresse foi obtido após normalização com o nível de expressão do gene de referência *rRNA 16S* que também foi determinado em simultâneo para cada condição controlo e condição de stresse.

#### 4.8 Construção do mutante de eliminação do gene *Rv1358*

A construção do mutante de eliminação do gene *Rv1358* foi iniciada neste trabalho mas não foi concluída, devido à falta de tempo para a sua otimização. A estratégia utilizada permite uma mutagenese dirigida que possibilita a disrupção do gene *Rv1358* por recombinação homóloga, para a obtenção de um mutante isogênico sem efeitos polares. O protocolo envolve a clonagem das porções a montante e jusante do gene *Rv1358* no cosmídeo pYUB854 e depois ligação ao fagemídeo phAE159, para originar um micobacteriofago de transdução especializada. Este micobacteriofago replica condicionalmente, em função da temperatura. A transdução do fago é amplificada na temperatura permissiva de 30°C, que é então utilizada para transduzir (infetar) as micobactérias a uma temperatura não permissiva de 37°C. Os transdutantes com o AES podem ser selecionados com meios seletivos que contenham antibiótico. Neste trabalho, foi efetuada a amplificação de dois fragmentos com cerca de 1200 pb do gene *Rv1358* (Fig.4.12A e 4.12B); conseguiu-se a construção do cosmídeo de interesse com as regiões do gene *Rv1358* clonadas no vetor (com 3800 bp) (Fig.4.12C) a montante e jusante de uma cassette de higromicina; o tamanho do cosmídeo construído foi de aproximadamente de 6200 pb; procedeu-se à sua ligação ao fagemídeo phAE159 (aproximadamente 50 kb), confirmando-se essa ligação com a presença de uma banda de cerca de 56 kb (Fig.4.12D).

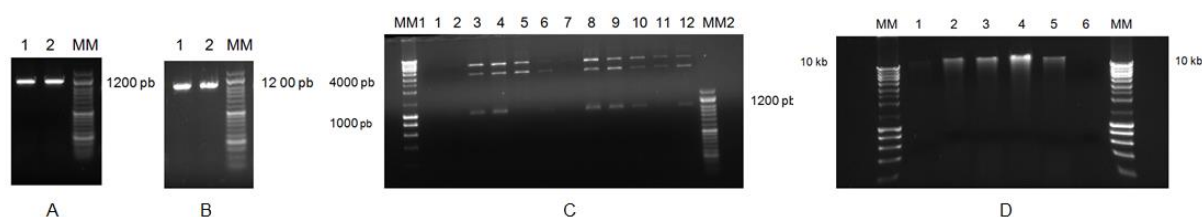


Fig.4.12– A e B: Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação por PCR das extremidades 5' e 3' do gene *Rv1358* (fragmentos com 1200 pb). C: Eletroforese em gel de agarose a 1% para a verificação da construção do cosmídeo (vetor pYUB854 já com a inserção do fragmento 5') confirmação da inserção do fragmento 3', com 1200 bp). 1, 2, 7 e 11: não transformantes; 3,4,5,6,8,9,10,12: transformantes; MM1 : Marcador de Peso molecular Ladder III Nzytech (Nzytech); MM2 : Marcador de massas moleculares Ladder VI Nzytech (Nzytech).D: Eletroforese em gel de agarose a 1% para a verificação da ligação do cosmídeo ao fagemídeo. Do 1 ao 5: presença de ligação (fragmento superior a 10 kb); 6: ausência de ligação; MM : Marcador de massas moleculares Ladder III Nzytech (Nzytech).

Após a confirmação de que o cosmídeo pYUB854/*Rv1358* se encontrava clonado no fagemídeo phAE159, o passo seguinte foi a transdução para *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, a qual, após várias tentativas, não foi bem sucedida, pois não foram obtidos eletrotransformantes verdadeiros. Esta abordagem requer eletroporação para introdução da construção genética na célula micobacteriana. É um processo complexo devido à relativamente baixa eficiência com a qual o DNA pode ser introduzido em micobactérias, especialmente nas de crescimento lento. Esta situação, em conjunto com a ineficiência de recombinação homóloga, resulta num desafio significativo na recuperação de mutantes de interesse e também limita a técnica às estirpes que são mais passíveis de transformação<sup>88</sup>.



## 5. Discussão final e perspectivas futuras

A interação entre *M. tuberculosis* e os macrófagos é um processo complexo que determina a evolução da infecção. Os modelos atuais de persistência micobacteriana invocam a presença de populações de células latentes que reativam sob imunossupressão do hospedeiro. O processo de *quorum sensing*, baseado na sinalização intra- e intercelular em resultado da acumulação de moléculas específicas, regula a expressão de genes que controlam atividades benéficas ao microrganismo, quando realizadas em sincronia. Dentro dessas atividades, destaca-se o processo de formação de biofilmes. O gene em foco neste trabalho, *Rv1358*, codifica presumivelmente um regulador transcricional da família LuxR. Esta família inclui proteínas envolvidas na regulação da expressão génica sujeita a fenómenos de *quorum*, algumas delas também responsáveis pela modulação do processo de formação de biofilmes<sup>42</sup>. No caso de *Rv1358*, não existiam à data de início deste trabalho quaisquer informações sobre a sua variabilidade nos genomas das bactérias do complexo MTC nem evidências experimentais sobre a sua função. Existem estudos que referem a possível relação entre o gene *Rv1358* e a virulência<sup>46</sup>, mas não existem trabalhos experimentais que fundamentem essa associação. Este gene apresenta uma organização pouco comum, compilando num só gene um domínio adenilato ciclase e um domínio LuxR. Esta associação em Actinobactérias é restrita aos membros do género *Mycobacterium*<sup>46</sup>. No estudo da presença de polimorfismos, os domínios que se encontram mais afetados são os de adenilato ciclase e ATPase. A resposta a estímulos ambientais mediada por esta proteína não é conhecida, tendo em conta que está prevista *in silico* uma ausência de atividade de adenilato ciclase, sendo este um aspeto a desvendar experimentalmente no futuro. De acordo com a modelação realizada, a proteína resultante dos polimorfismos não conservativos encontrados, 442\_D>A e 1112\_G>E, presente em estirpes de *M. bovis* e *M. tuberculosis* respetivamente, apresenta consequências estruturais, verificando-se que estas alterações provocam um rearranjo tridimensional distinto com alteração da posição espacial dos domínios funcionais e subsequente interação com ligandos/substratos. Um estudo baseado em análise de regressão logística, que foi publicado já no decurso do presente trabalho, sugere que a variação genómica presente em genes com domínios adenilato ciclase e LuxR, registada em estirpes clínicas do MTC, indica pseudogenização. No gene *Rv1358*, a pseudogenização parece estar associada às estirpes da linhagem Euro-Americana. Relativamente à análise filogenética estabelecida neste trabalho, foi possível concluir que o gene *Rv1358* nas estirpes de *M. bovis* e *M. tuberculosis* analisadas apresenta uma história microevolutiva diferente, que possivelmente reflete as adaptações geográficas e adaptação específica dos dois agentes etiológicos aos respetivos hospedeiros. Verifica-se ainda um cenário de pressão seletiva em *M. bovis* para conservação do gene *Rv1358*, o que sugere que a proteína resultante exerça uma função biológica importante neste ecotipo. Também não foram encontrados polimorfismos no gene *Rv1358* nos isolados de campo de *M. bovis*

que circulam em Portugal, face à sequência de *M. tuberculosis* H37Rv. Estes resultados contrastam com o cenário de pseudogeneização que aparenta estar amplamente distribuído em estirpes circulantes de *M. tuberculosis*, em que se verifica que o gene *Rv1358* está sujeito à acumulação de numerosas mutações que poderão danificar os seus domínios regulatórios e destruir o potencial de codificação de uma proteína funcional. Não obstante, deve manter-se em mente que existem evidências recentes de que os pseudogenes podem exercer um papel regulatório sobre os seus genes parentais. Pensa-se que esta regulação possa ser mediada por RNAs não codificantes resultantes da transcrição ativa dos pseudogenes. Quando os níveis de transcrição do pseudogene são alterados, prevêem-se consequências a nível da estabilidade do mRNA do gene parental <sup>89</sup>. Em *Mycobacterium tuberculosis*, o gene *Rv0386* possui aparentemente salvaguardadas as funções de LuxR e de adenilato ciclase, sem alterações registadas nestes domínios funcionais<sup>47</sup>, pelo que especulamos que esse possa ser o gene parental de *Rv1358*. Foi ainda efetuada uma análise da região a montante da unidade de transcrição do gene *Rv1358*, para detetar eventuais polimorfismos na região promotora que poderiam afetar a expressão do gene mediante diferentes estímulos, mas tais não foram encontrados, o que sugere a conservação da região promotora, à qual se poderão ligar fatores de transcrição. Da análise bioinformática realizada, constata-se ainda a possibilidade do gene *Rv1358* ter um local alternativo de transcrição, que não a partir do promotor canónico, com local de ligação de *sigF* a meio do gene (promotor intragénico). Isto originará a transcrição de um mRNA truncado: a análise *in silico* da tradução do transcrito intragénico dependente de *sigF* indica a formação de uma proteína deficitária em cerca de 250 resíduos na extremidade N-terminal, que corresponde à eliminação do domínio de adenilato ciclase. Se existem duas formas funcionais da proteína *Rv1358* é atualmente ainda desconhecido. Por outro lado, a produção de um RNA não codificante resultante da transcrição parcial da CDS em análise poderá igualmente exercer efeitos regulatórios em *trans*, estando hoje em discussão na comunidade científica o papel biológico dos pseudogenes, nomeadamente na regulação de genes congéneres intactos, funcionais e outros. Para se realizar o estudo da resposta fisiológica de estirpes virulentas de *M. bovis* a condições de stresse ambiental que visam mimetizar o ambiente do hospedeiro, foram selecionadas condições como o stresse oxidativo, nitrosativo e a presença de colesterol. Para além das considerações já tecidas, é de destacar o efeito exercido pelo ácido ascórbico no crescimento de *M. bovis* II que, apesar do stresse imprimido, estimulou o metabolismo e a quantidade de biomassa final, bem como a taxa específica de crescimento. Relativamente à formação de biofilme na presença de múltiplos stresses, verificou-se, no geral, que a diminuição de viabilidade na presença dos vários compostos testados conduz à diminuição da formação de biofilme. Por outro lado, os valores mais elevados de biofilme formado estão associados aos valores de sobrevivência, identificando-se uma relação linear entre as duas variáveis na maioria das condições estudadas. A exceção é o efeito exercido pelo composto NPS em todas as estirpes testadas, nas quais, apesar da



diminuição drástica da sobrevivência, se regista um aumento da formação de biofilmes, sugerindo que esta possa ser uma estratégia de resposta da comunidade ao stresse. No que respeita ao perfil da expressão genética dos genes *Rv1358* e *sigF*, verificou-se que esta se encontra diminuída na maioria das condições ambientais de stresse estudadas e que os níveis de expressão variam com a estirpe estudada. Na estirpe de *M. bovis* I; a presença de ácido ascórbico no meio de cultura conduziu a um aumento da expressão de *Rv1358* de nove vezes e oito vezes de *sigF*, não se registando a mesma tendência em *M. bovis* II, na qual a expressão se encontra diminuída. Os resultados encontrados nos perfis de expressão global por *microarrays* disponíveis na base de dados *TB Database* são concordantes com os obtidos neste trabalho, com exceção da expressão do gene *Rv1358* na condição do colesterol que se encontra diminuída, ao contrário do que está descrito<sup>85</sup>. Este resultado pode ser explicado pelos diferentes tempos de incubação e por diferenças na espécie do MTC estudada. Análises baseadas em RNAseq a serem realizadas no futuro, dando continuidade ao presente trabalho, permitirão perceber se a transcrição de *Rv1358* pode ser articulada com redes globais de expressão génica, permitindo inferir se este gene assegura ou não uma função biológica importante. Relativamente a outros possíveis trabalhos futuros neste âmbito, salienta-se a necessidade de conclusão da construção do mutante de eliminação, melhorando-se a técnica de eletroporação para se conseguir uma transfeção com sucesso. Os passos seguintes implicam a preparação e quantificação do lisado fágico e subsequente transdução de *M. bovis*. Segue-se PCR e sequenciação para se confirmar a disrupção do gene alvo. A inclusão de locais de resolvase flanqueando a cassette de resistência à higromicina, que assegurámos quando iniciámos a construção do cosmídeo, permitirá a remoção do gene de resistência, originando mutantes de eliminação não marcados. Após a obtenção do mutante de eliminação isogénico do gene *Rv1358*, será efetuada uma análise fenotípica e funcional e avaliação da resposta do mutante às condições ambientais já estudadas, e comparação com a estirpe selvagem, por forma a verificar a importância deste gene na resposta aos stresses ambientais. Será ainda possível realizar outros ensaios, por exemplo *in vitro* em linhas celulares de macrófagos, para avaliar as diferenças na sobrevivência intracelular da estirpe mutante e selvagem, ou em modelos animais de infeção, para aferir diferenças na virulência, por avaliação da sobrevivência dos animais em estudo e pela extensão das lesões histológicas causadas pelo mutante em comparação com a estirpe selvagem.

## 6. Referências Bibliográficas

- [1] D. Brites e S. Gagneux, "Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*," *Immunological Reviews*, vol. 264, p. 6–24, 2015.
- [2] E. Cambau e M. Drancourt, "Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 20, p. 196-201, 2014.
- [3] J. C. Sousa e W. C. Ferreira, *Microbiologia - Volume 2*, Lidel, 2000, p. 86-97.

- [4] Organização Mundial de Saúde, "Global tuberculosis report 2015," *Global tuberculosis report*, p. 18-22, 2015.
- [5] V. Naranjo, C. Gortazar, J. Vicente e J. d. I. Fuente, "Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex," *Veterinary Microbiology*, vol. 127, p. 1-9, 2008.
- [6] T. C. Thacker, M. V. Palmer e W. R. Waters, "Associations between cytokine gene expression and pathology in *Mycobacterium bovis* infected cattle," *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 199, p. 204–213, 2007.
- [7] I. Schiller, B. Oesch, H. M. Vordermeier, M. V. Palmer, B. N. Harris, K. A. Orloski, B. M. Buddle, T. C. Thacker, K. P. Lyashchenko e W. R. Waters, "Bovine Tuberculosis: A Review of Current and Emerging Diagnostic Techniques in View of their Relevance for Disease Control and Eradication," *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 57, p. 205–220, 2010.
- [8] B. Saviola e W. Bishai, "The Genus *Mycobacterium*—Medical," em *Prokaryotes*, vol. 3, 2006, p. 919–933.
- [9] M. M. Pádua, *Patologia Clínica para técnicos-Bacteriologia*, Lusociência, 2009, p. 275-296.
- [10] J. P. Euzéby, "List of prokaryotic names with standing in nomenclature," 1997. [Online]. Available: <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html> . [Acedido em 30 Dezembro 2015].
- [11] R. Brosch, S. V. G. M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, K. Kremer, L. M. Parson, S. S. A. S. Pym, D. v. Soolingen e S. T. Cole, "A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex," *PNAS*, vol. 99, p. 3684–3689, 2002.
- [12] J. Liu, C. E. Barry, G. S. Besra e H. Nikaido, "Mycolic Acid Structure Determines the Fluidity of the Mycobacterial Cell Wall," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, p. 29545–29551, 1996.
- [13] A. Bhatt, V. Molle, G. Besra, W. R. Jacobs e L. Kremer, "The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development," *Molecular Microbiology*, p. 1442–1454, 2007.
- [14] I. Vergne, G. Martine e N. Jérôme, "Manipulation of the endocytic pathway and phagocyte functions by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 4, p. 1-9, 2015.
- [15] M. Skoric, E. Shitaye, R. Halouzka, P. Fictum, I. Trcka, M. Heroldova, E. Tkadlec e I. Pavlik, "Tuberculous and tuberculoid lesions in free living small terrestrial mammals and the risk of infection to humans and animals: a review," *Veterinarni Medicina*, vol. 52, p. 144–161, 2007.
- [16] P. R. Marri, J. P. Bannantine e G. B. Golding, "Comparative genomics of metabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer," *Federation of European Microbiological Societies*, vol. 30, p. 906–925, 2006.
- [17] K. M. Derbyshire e T. A. Gray, "Distributive Conjugal Transfer: New Insights into Horizontal Gene Transfer and Genetic Exchange in *Mycobacteria*," *American Society for Microbiology*, vol. 2, p. MGM2-0022-2013, 2014.
- [18] T. D. Mortimer e C. S. Pepperell, "Genomic signatures of distributive conjugal transfer among mycobacteria.," *Society for Molecular Biology and Evolution*, vol. 6, p. 2489–2500, 2014.
- [19] S. T. Cole, R. Brosch, T. G. J. Parkhill, C. Churcher, S. V. G. D. Harris, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, F. Tekaia, D. B. K. Badcock, D. Brown, R. C. T. Chillingworth e R. Davies, "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence," *Nature*, vol. 393, p. 537-544, 1998.

- [20] T. Garnier, K. Eiglmeier, J.-C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon e B. Harris, "The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*," *PNAS*, vol. 100, p. 7877–7882, 2003.
- [21] A. S. Mustafa, "The Future of of *Mycobacterium tuberculosis*-Specific Antigens/Peptides in Tuberculin Skin Testing for the Diagnosis of Tuberculosis," *Mycobacterial Diseases*, vol. 4, e127, 2014.
- [22] M. D. Miner, J. C. Chang, A. K. Pandey, C. M. Sasseti e D. R. Sherman, "Role of Cholesterol in *Mycobacterium tuberculosis* infection," *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 47, p. 407–411, 2009.
- [23] H. Ouellet, J. B. Johnston e P. R. O. d. Montellano, "Cholesterol catabolism as a therapeutic target in *Mycobacterium tuberculosis*," *Elsevier*, vol. 19, p. 530–539, 2011.
- [24] L. Jordao e O. V. Vieira, "Tuberculosis: New Aspects of an Old Disease," *International Journal of Cell Biology*, vol. 2011, 403623, 2011.
- [25] D. G. Russell, "*Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 2, p. 569–577, 2001.
- [26] M. Bartos, J. Falkinham e I. Pavlik, "Mycobacterial catalases, peroxidases, and superoxidedismutases and their effects on virulence andisoniazid-susceptibility in mycobacteria – a review," *Veterinary Medicine*, vol. 5, p. 161–170, 2004.
- [27] R. K. Verma, A. K. Singh, M. Mohan, A. K. Agrawal, P. R. P. Verma, A. Gupta e A. Misra, "Inhalable Microparticles Containing Nitric Oxide Donors: Saying NO to Intracellular *Mycobacterium tuberculosis*," *Molecularpharmaceutics*, vol. 9, p. 3183–3189, 2012.
- [28] D. S. Korb, B. E. Schneider e U. E. Schaible, "Innate immunity in tuberculosis: myths and truth," *Microbes and Infection*, vol. 10, p. 995–1004, 2008.
- [29] K. H. z. Bentrup e D. G. Russell, "Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment," *TRENDS in Microbiology*, vol. 9, p. 597–605, 2001.
- [30] C. Boon e T. Dick, "How *Mycobacterium tuberculosis* goes to sleep: the dormancy survival regulator DosR a decade later," *Future Medicine Ltd*, vol. 7, p. 513–518, 2012.
- [31] E. H. S. Sousa, J. R. Tuckerman, G. Gonzalez e M.-A. Gilles-Gonzalez, "DosT and DevS are oxygen-switched kinases in *Mycobacterium tuberculosis*," *Protein Science*, vol. 16, p. 1708–1719, 2007.
- [32] M. Voskuil, K. Viscontib e G. Schoolnikb, "*Mycobacterium tuberculosis* gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy," *Elsevier*, vol. 84, p. 218–227, 2004.
- [33] A. M. Abdallah, N. C. G. v. Pittius, P. A. D. Champion, J. Cox, J. Luirink, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, B. J. Appelmek e W. Bitter, "Type VII secretion — mycobacteria show the way," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 5, p. 883–891, 2007.
- [34] W. M. Dunne, "Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?," *American Socieity for Microbiology*, vol. 15, p. 155–166, 2002.
- [35] S. Ishida, M. Arai, H. NiiKawa e M. Kobayashi, "Inhibitory Effect of Cyclic Trihydroxamate Siderophore, Desferrioxamine E, on the Biofilm Formation of *Mycobacterium* Species," *Biological Pharmaceutical bulletin*, vol. 6, p. 917–920, 2011.

- [36] A. K. Ojha, X. Trivelli, Y. Guerardel, L. Kremer e G. F. Hatfull, "Enzymatic Hydrolysis of Trehalose Dimycolate Releases Free Mycolic Acids during Mycobacterial Growth in Biofilms," *The Journal of the Biological Chemistry*, vol. 285, p. 17380–17389, 2010.
- [37] D. Davies, "Understanding biofilm resistance to antibacterial agents," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 2, p. 114-122, 2003.
- [38] A. K. Ojha, A. D. Baughn, D. Sambandan, T. Hsu, X. Trivelli, Y. Guerardel, A. Alahari, L. Kremer, W. R. J. Jr e G. F. Hatfull, "Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria," *Molecular Microbiology*, vol. 69, p. 164-174, 2008.
- [39] G. Carter, M. Wu, D. C. Drummond e L. E. Bermudez, "Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 52, p. 747–752, 2003.
- [40] L. Marsollier, J. Aubry, E. Coutanceau, J.-P. S. André, P. L. Small, G. Milon, P. Legras, S. Guadagnini, B. Carbonnelle e S. T. Cole, "Colonization of the salivary glands of cimicoides plasmatocytes and a macrolide toxin, mycolactone," *Cellular Microbiology*, vol. 7, p. 935–943, 2005.
- [41] J. M. Pang, E. Layre, L. Sweet, A. Sherrid, D. B. Moody, A. Ojha e D. R. Sherman, "The Polyketide Pks1 Contributes to Biofilm Formation in *Mycobacterium tuberculosis*," *American Society for Microbiology*, vol. 194, p. 715–721, 2012.
- [42] S. T. Rutherford e B. L. Bassler, "Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control," *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, vol. 2, a012427, 2012.
- [43] W. D. Bauer e U. Mathesius, "Plant responses to bacterial quorum sensing signals," *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 7, p. 429–433, 2004.
- [44] M. M. Kendall, D. A. Rasko e V. Sperandio, "Global Effects of the Cell-to-Cell Signaling Molecules Autoinducer-2, Autoinducer-3, and Epinephrine in a luxS Mutant of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*," *Infection and Immunity*, vol. 75, p. 4875–4884, 2007.
- [45] S. P. Diggle, A. S. Griffin, G. S. Campbell e S. A. West, "Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations," *Letters for Nature*, vol. 450, p. 411-414.
- [46] C. L. Santos, M. Correia-Neves, P. Moradas-Ferreira e M. V. Mendes, "A Walk into the LuxR Regulators of Actinobacteria: Phylogenomic Distribution and Functional Diversity," *Plos One*, vol. 7, e46758, 2012.
- [47] C. L. Santos, H. Nebenzahl-Guimaraes, M. V. Mendes, D. v. Soolingen e M. Correia-Neves, "To Be or Not to Be a Pseudogene: A Molecular Epidemiological Approach to the mclx Genes and Its Impact in Tuberculosis," *Pos One*, vol. 10, e0128983, 2015.
- [48] M. Alonso-Hearn, T. M. Eckstein, S. Sommer e L. E. Bermudez, A *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* LuxR regulates cell envelope and virulence, vol. 16, SAGE journals, 2010, p. 235–247.
- [49] R. C. Hartkoorn, C. Sala, S. Uplekar, P. Busso, J. Rougemont e S. T. Colea, "Genome-Wide Definition of the SigF Regulon in *Mycobacterium tuberculosis*," *Journal of Bacteriology*, vol. 194, p. 2001–2009, 2012.
- [50] J. M. Lew, A. Kapopoulou, L. M. Jones e S. T. Cole, "TubercuList – 10 years after," *Elsevier*, vol. 91, p. 12-17, 2011.
- [51] M. Ashburner, C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris e D. P. Hill, "Gene Ontology: tool for the unification of biology," *Nature Genetics*, vol. 25, p. 25 - 29, 2000.

- [52] F. Coll, M. Preston, J. A. Guerra-Assunção, G. Hill-Cawthorn, D. Harris, J. Perdigão, M. Viveiros, I. Portugal e F. Drobniowski, "PolyTB: A genomic variation map for *Mycobacterium tuberculosis*," *Elsevier*, vol. 94, p. 346-354, 2014.
- [53] L. Y. Geer, A. Marchler-Bauer, R. C. Geer, L. Han, J. He, S. He, W. S. Chunlei Liu e S. H. Bryant, "The NCBI BioSystems database," *Nucleic Acids Research*, vol. 38, p. D492–D496, 2010.
- [54] A. Mitchell, H.-Y. Chang, L. Daugherty, M. Fraser, S. Hunter, R. Lopez, C. McAnulla, C. McMenamin, G. Nuka, S. Pesseat, A. Sangrador-Vegas, M. Scheremetjew, C. Rato, S.-Y. Yong, A. Bateman e M. Punta, "The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years," *Nucleic Acids Research*, vol. 43, p. D213-D221, 2015.
- [55] R. D. Finn, A. Bateman, J. Clements, P. Coghill, R. Y. Eberhardt, S. R. Eddy, A. Heger, K. Hetherington, L. Holm, J. Mistry, E. L. L. Sonnhammer, J. Tate e M. Punta, "Pfam: the protein families database," *Nucleic Acids Research*, vol. 42, p. D222–D230, 2014.
- [56] T. B. K. Reddy, R. Riley, F. Wymore, P. Montgomery, D. DeCaprio, R. Engels, M. Gellesch, J. Hubble3, D. Jen, H. Jin, M. Koehrsen, L. Larson, M. Mao, M. Nitzberg, P. Sisk, C. Stolte e B. Weine, "TB database: an integrated platform for tuberculosis research," *Nucleic Acids Research*, vol. 37, p. D499-D508, 2009.
- [57] S. Turkarslan, E. J. Peterson, T. R. Rustad, K. J. Minch, D. J. Reiss, R. Morrison, S. Ma, N. D. Price, D. R. Sherman e N. S. Baliga, "A comprehensive map of genome-wide gene regulation in *Mycobacterium tuberculosis*," *Scientific Data*, vol. 2, p. 150010, 2015.
- [58] M. Kuhn, D. Szklarczyk, S. Pletscher-Frankild, T. H. Blicher, C. v. Mering, L. J. Jensen e P. Bork, "STITCH 4: integration of protein–chemical interactions with user data," *Nucleic Acids Research*, vol. 42, p. D401–D407, 2014.
- [59] D. Szklarczyk, A. Franceschini, S. Wyder, K. Forslund, D. Heller, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, A. Roth, A. Santos, K. P. Tsafou, M. Kuhn, P. Bork, L. J. Jensen e C. v. Mering, "STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life," *Nucleic Acids Research*, vol. 43, p. D447-D452, 2015.
- [60] Y. Nakamura, T. Gojobori e T. Ikemura, "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000," *Nucleic Acids Research*, vol. 28, p. 292, 2000.
- [61] P. Artimo, M. Jonnalagedda, K. Arnold, D. Baratin, G. Csardi, E. d. Castro, S. Duvaud, V. Flegel, A. Fortier, E. Gasteiger, A. Grosdidier, C. Hernandez e V. Ioannidis, "ExPASy: SIB bioinformatics resource portal," *Nucleic Acids Research*, vol. 40, p. W597-W603, 2012.
- [62] L. A. Kelley, S. Mezulis, C. M. Yates, M. N. Wass e M. J. E. Sternberg, "The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis," *Nature Protocols*, vol. 10, p. 845-858, 2015.
- [63] W. Liu, Y. Xie, J. Ma, X. Luo, P. Nie, Z. Zuo, U. Lahrmann, Q. Zhao, Y. Zheng, Y. Zhao, Y. Xue e J. Ren, "IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences," *Bioinformatics*, vol. 31, p. 3359–3336, 2015.
- [64] A. Rambaut, "Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology," 2007. [Online]. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. [Acedido em 2 novembro 2015].
- [65] S. Bardarov, J. Svetoslav Bardarov, J. Martin S. Pavelka, V. Sambandamurthy, M. Larsen, J. Tufariello, J. Chan, G. Hatfull e J. William R. Jacobs, "Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*," *Microbiology*, vol. 148, p. 3007-3017, 2002.

- [66] T. Cui, L. Zhang, X. Wang e Z.-G. He, "Uncovering new signaling proteins and potential drug targets through the interactome analysis of *Mycobacterium tuberculosis*," *BMC Genomics*, vol. 10, p. 118, 2009.
- [67] M. A. Flores-Valdez, M. d. J. Aceves-Sánchez, S. A. Montero-Pérez, A. D. Sánchez-López, J. A. Gutiérrez-Pabello e R. Hernández-Pando, "Vaccination of mice with recombinant bacille Calmette-Guérin harboring Rv1357c protects similarly to native BCG," *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, vol. 16, p. 774–776, 2012.
- [68] K. Gupta, P. Kumar e D. Chatterji, "Identification, Activity and Disulfide Connectivity of C-di-GMP Regulating Proteins in *Mycobacterium tuberculosis*," *Plos One*, vol. 5, e15072, 2010.
- [69] A. R. Shenoy, K. Sivakumar, A. Krupa, N. Srinivasan e S. S. Visweswariah, "A survey of nucleotide cyclases in Actinobacteria: unique domain organization and expansion of the class III cyclase family in *Mycobacterium tuberculosis*," *Wiley InterScience*, vol. 5, p. 17-38, 2004.
- [70] N. M. Nesbitt, X. Yang, P. Fontan, I. Kolesnikova, I. Smith, N. S. Sampson e E. Dubnau, "A Thiolase of *Mycobacterium tuberculosis* Is Required for Virulence and Production of Androstenedione and Androstadienedione from Cholesterol," *Infection and Immunity*, vol. 78, p. 275-282, 2010.
- [71] R. J. Dubos e B. D. Davis, "Factors affecting the growth of Tubercle Bacilli in Liquid Media," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 83, p. 409-423, 1946.
- [72] U. Schwaba, K. H. Rohdea, Z. Wangb, P. R. Chessb, R. H. Notterb e D. G. Russell, "Transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to lung surfactant," *National Institutes of Health*, vol. 46, p. 185-193, 2009.
- [73] T. Parish e N. G. Stoker, *Mycobacterium tuberculosis* Protocols, Humana Press, 2001, p. 55.
- [74] G. A. O'Toole, L. A. Pratt, P. I. Watnick, D. K. Newman, V. B. Weaver e R. Kolter, "Genetic approaches to study of biofilms," *Methods in Enzymology*, vol. 310, p. 91–109, 1999.
- [75] M. I. Voskuil, I. L. Bartek, K. Visconti e G. K. Schoolnik, "The response of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive oxygen and nitrogen species," *Frontiers in Microbiology*, vol. 2, 105, 2011.
- [76] E. Cabiscol, J. Tamarit e J. Ros, "Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species," *Internatl Microbiol*, vol. 3, p. 3-8, 2000.
- [77] A. D. Baughn, S. J. Garforth, C. Vilcheze e J. William R. Jacobs, "An Anaerobic-Type  $\alpha$ -Ketoglutarate Ferredoxin Oxidoreductase Completes the Oxidative Tricarboxylic Acid Cycle of *Mycobacterium tuberculosis*," *PLoS Pathogens*, vol. 5, e1000662, 2009.
- [78] X. M. Wang, K. Soetaert, P. Peirs, M. Kalai, V. Fontaine, J. P. Dehay e P. Lefèvre, "Biochemical Analysis of the NAD<sup>+</sup>-Dependent Malate Dehydrogenase, a Substrate of Several Serine/Threonine Protein Kinases of *Mycobacterium tuberculosis*," *Plos one*, vol. 10, e0123327, 2015.
- [79] H. Eoh e K. Y. Rhee, "Multifunctional essentiality of succinate metabolism in adaptation to hypoxia in *Mycobacterium tuberculosis*," *PNAS*, vol. 110, p. 6554–6559, 2013.
- [80] N. K. Taneja, S. Dhingra, A. Mittal, M. Naresh e J. S. Tyagi, "*Mycobacterium tuberculosis* Transcriptional Adaptation, Growth Arrest and Dormancy Phenotype Development Is Triggered by Vitamin C," *Plos One*, vol. 5, e10860, 2010.

- [81] S. Pawaria, A. Lama, M. Rajee K. L. Dikshit, "Responses of *Mycobacterium tuberculosis* Hemoglobin Promoters to In Vitro and In Vivo Growth Conditions," *American Society for Microbiology*, vol. 74, p. 512–3522, 2008.
- [82] G. S. John, N. Brot, J. Ruan, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, H. Weissbach e C. Nathan, "Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage reactive nitrogen intermediates," *PNAS*, vol. 98, p. 9901–9906, 2001.
- [83] M. A. Firmani e L. W. Riley, "Reactive Nitrogen Intermediates Have a Bacteriostatic Effect on *Mycobacterium tuberculosis* In Vitro," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, p. 3162–3166, 2002.
- [84] M. N. Hughes, "Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1411, p. 263–272, 1999.
- [85] N. M. Nesbitt, X. Yang, P. Fontan, I. Kolesnikova, I. Smith, N. S. Sampson e E. Dubnau, "A Thiolase of *Mycobacterium tuberculosis* Is Required for Virulence and Production of Androstenedione and Androstadienedione from Cholesterol," *Infection and Immunity*, vol. 78, p. 275–282, 2010.
- [86] A. E. Greenstein, J. A. MacGurn, C. E. Baer, A. M. Falick, J. S. Cox e T. Alber, "*M. tuberculosis* Ser/Thr Protein Kinase D Phosphorylates an Anti-Anti-Sigma Factor Homolog," *PLoS Pathogens*, p. 475–483, 2007.
- [87] Y. Lim, M. Jana, T. T. Luong e C. Y. Lee, "Control of Glucose- and NaCl-Induced Biofilm Formation by rbf in *Staphylococcus aureus*," *Journal of Bacteriology*, vol. 186, p. 722–729, 2004.
- [88] J. M. Tufariello, A. A. Malek, C. Vilchèze, L. E. Cole, H. K. Ratner, P. A. González, P. Jain, G. F. Hatfull, M. H. Larsen e J. William R. Jacobs, "Enhanced Specialized Transduction Using Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*," *Mbio*, vol. 5, e01179–14, 2014.
- [89] R. C. Pink, D. P. C. Kate Wicks, E. K. Punch, L. Jacobs e D. R. F. Carter, "Pseudogenes: Pseudo-functional or key regulators in health and disease?," *RNA Society*, vol. 17, p. 792–798, 2011.
- [90] S. B. Snapper, R. E. Melton, S. Mustafa, T. Kieser e W. R. Jr, "Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*," *Molecular Microbiology*, vol. 4, p. 1911–1919, 1990.
- [91] H. W. Boyer e D. Roulland-dussoix, "A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*," *Journal of Molecular Biology*, vol. 41, p. 459–472, 1969.
- [92] T. R. Rustad, M. I. Harrell, R. Liao e D. R. Sherman, "The Enduring Hypoxic Response of *Mycobacterium tuberculosis*," *Plos One*, vol. 3, e1502, 2008.
- [93] R. W. Honaker, R. L. Leistikow, I. L. Bartek e M. I. Voskuil, "Unique Roles of DosT and DosS in DosR Regulon Induction and *Mycobacterium tuberculosis* Dormancy," *American Society for Microbiology*, vol. 77, p. 3258–3263, 2009.

## 7. Anexos

**Tabela A7.1 - Lista de sequências nucleotídicas e aminoácídicas utilizadas na análise bioinformática de polimorfismos do gene *Rv1358* e da proteína *Rv1358***

Sequências nucleotídicas <i>Rv1358</i>	Nº de acesso	Data da consulta	Sequências aminoácídicas <i>Rv1358</i>	Nº de acesso	Data da consulta
<i>M. bovis</i> 04-303 MB04303	AVSW01000001.1	25-02-2015	<i>M. africanum</i> GM 41182	WP_013988832.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> AF2122-97	BX248338.1	25-02-2015	<i>M. africanum</i> K85	WP_003910335.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> ATCC BAA-935	CP009449.1	25-02-2015	<i>M. africanum</i> MAL010131	WP_031670234.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> 0822-11 MB082211	JQEW01000001.1	25-02-2015	<i>M. bovis</i> AF212/ 97	WP_010950528.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> 534 MB534	JQEM01000001.1	25-02-2015	<i>M. bovis</i> BCG str. ATCC 35743	AHM07114.1	25-02-2015
<i>M. bovis</i> 61-09 MB6109	JQEX01000001.1	25-02-2015	<i>M. bovis</i> BCG str. Pasteur 1173 P2	WP_011799172.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> 50 MB50	JQEU01000001.1	25-02-2015	<i>M. canettii</i> CIPT 140010059	WP_014000723.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> 49-09 MB4909	JQES01000001.1	25-02-2015	<i>M. canettii</i> CIPT 140070008	WP_015302957.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> 45-08B MB4508B	JQEP01000001.1	25-02-2015	<i>M. canettii</i> CIPT 140070017	WP_015292885.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> 35 MB35	JQEV01000001.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> 1755BN	WP_031737349.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> 32-08 MB3208	JQER01000001.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> 2100HD	WP_044093754.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> 18-08C MB1808C	JQEQ01000001.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> 3280CJ	WP_031658026.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> 09-1193 MB091193	JQEN01000001.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> 3499MM	WP_031712231.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> 09-1192 MB091192	JQEO01000001.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> 7199-99	WP_015345063.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> 09-1191 MB091191	JFPF01000001.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> BTB04-388	WP_031653049.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> strain 08-08BF2 MB0808BF2	JQET01000001.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> BTB07-206	WP_031683682.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> strain 05-567 MB05567	JPFQ01000030.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> BTB07-324	WP_031682950.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> strain 05-566 MB05566	JPFR01000035.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> BTB08-356	WP_031657618.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> BCG 3281	D09050704640000	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> BTB10-277	KCP87762.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> BCG Tokyo 172	AP010918.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> BTB10-295	WP_031666520.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> BCG Moreau RDJ	AM412059.2	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> BTB11-160	KCQ49580.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> BCG Mexico	CP002095.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> BTB11-210	WP_031675076.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> BCG Korea 1168P	CP003900.2	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> BTB12-162	WP_031646984.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> BCG ATCC 35743	CP003494.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> C	EAY59677.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> BCG Pasteur 1173P2	AM408590.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> CCDC5079	AEJ46447.1	26-02-2015
<i>M. bovis</i> AN5 MBAN5	AWPL01000001.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> CDC1551	WP_010924386.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> 18b	CP007299.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> CPHL_A	WP_003909411.1	26-02-2015



<i>M. tuberculosis</i> 49-02	HG813240.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> EAI5	WP_020824490.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> 7199-99	HE663067.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (referência)	Tuberculist <sup>50</sup>	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> BT1	CP002883.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> H1329	WP_031688457.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> BT2	CP002882.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> H2754	WP_031686021.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> CAS-NITR204	CP005386.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> KT-0064	WP_031656585.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> CCDC5079	CP002884.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> KT-0072	WP_031662599.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> CCDC5180	CP002885.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> KT-0086	WP_031663634.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> CDC1551	AE000516.2	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> M1010	WP_031679799.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> CTIRI-2	CP002992.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> M1011	WP_031678027.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> EAI5	CP006578.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> M1025	WP_031680925.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> EAI5-NITR206	CP005387.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> M1397	WP_031680398.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> F11	CP000717.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> M1560	WP_031722666.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	CP000611.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> M2116	WP_031734051.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (referência)	Tuberculist <sup>50</sup>	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> M2132	KBC56269.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> HKBS1	CP002871.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> M2134	WP_031733031.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> K	CP007803.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> M2141	WP_031666219.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> RGTB327	CP003233.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> MAL010080	WP_031676147.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> RGTB423	CP003234.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> MAL010103	WP_031675952.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> Beijing-NITR203	CP005082.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> NRITLD17	WP_031744996.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> Erdman/ATCC 35801	AP012340.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> NRITLD44	WP_042755963.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> Haarlem	CP001664.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> OFXR-6	WP_031706971.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> Haarlem-NITR202	CP004886.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> str. Erdman = ATCC 35801	WP_031728153.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> Kurono	AP014573.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> str. Haarlem	WP_003900324.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> OA005DS	CP008983.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> SUMu004	EF23848.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> OA029DS	CP008981.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> TKK_01_0037	WP_031718557.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> OA033DS	CP008980.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> TKK_02_0047	WP_031721806.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> OA036DS	CP008979.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> TKK_03_0061	WP_031711947.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> OA087DS	CP008978.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> TKK_04_0080	WP_031732280.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> OA092DS	CP008977.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> TKK_01_0092	WP_031708687.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> OA093DS	CP008976.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> TKK_04_0149	KBT97373.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> OA094DS	CP008975.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> UT0056	KBK82683.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> OA115DS	CP008974.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> W-148	WP_003910824.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> OA117DS	CP008973.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> XTB13-108	WP_031713236.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> OB026XDR	CP008972.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> XTB13-121	WP_031748881.1	26-02-2015

<i>M. tuberculosis</i> OB070XDR	CP008970.1	25-02-2015	<i>M. tuberculosis</i> XTB13-123	WP_031732256.1	26-02-2015
<i>M. tuberculosis</i> OB123ND	CP008968.1	25-02-2015			
<i>M. tuberculosis</i> OB169XDR	CP008967.1	25-02-2015			
<i>M. tuberculosis</i> OB218DS	CP008966.1	25-02-2015			
<i>M. tuberculosis</i> OB222DS	CP008965.1	25-02-2015			
<i>M. tuberculosis</i> OB228DS	CP008964.1	25-02-2015			
<i>M. tuberculosis</i> OB229DS	CP008963.1	25-02-2015			
<i>M. tuberculosis</i> OB235DS	CP008962.1	25-02-2015			
<i>M. tuberculosis</i> OB259XDR	CP008961.1	25-02-2015			
<i>M. tuberculosis</i> OB329XDR	CP008960.1	25-02-2015			
<i>M. tuberculosis</i> 6A024XDR	CP008959.1	25-02-2015			
<i>M. tuberculosis</i> 96075	CP009426.1	25-02-2015			
<i>M. tuberculosis</i> 96121	CP009427.1	25-02-2015			
<i>M. tuberculosis</i> KIT87190	CP007809.1	25-02-2015			
<i>M. tuberculosis</i> ZMC13-88	CP009101.1	25-02-2015			
<i>M. tuberculosis</i> ZMC13-264	CP009100.1	25-02-2015			
<i>M. tuberculosis</i> UT205	HE608151.1	25-02-2015			

**Tabela A.7.2 - Lista de *primers* utilizados no presente trabalho**

Região alvo	Posição no genoma	Sequência oligonucleotídica dos <i>Primers</i>	Temperatura de hibridação teórica (°C)	Massa Molecular do fragmento (pb)	Referências/ objetivo
<i>Rv1358</i>	1526562 - 1526581 1526654 - 1526673	5' gtaaagctcgtcacccaagg 3' 5' tgacgtcgagcttggtgtag 3'	70	112	Este trabalho  (expressão genética)
<i>sigF</i>	3661715 - 3661734 3661609 - 3661628	5' actgcatctgcggctaggta 3' 5' gccagcaaaccttcgataac 3'	70 68	126	Este trabalho  (expressão genética)
16 S	1468929 - 1468948 1469181 - 1469200	5' aagaagcaccggccaactac 3' 5' tcgctcctcagcgtagtta 3'	61.66 62.21	272	Este trabalho  (expressão genética)
<i>Rv1358</i>	1526542 - 1526561 1527960 - 1527941	5' ccagcggtttctacgggcg 3' 5' cgccggcagatctcgctcac 3'	76	1399	(Santos, <i>et al.</i> , 2015) <sup>47</sup> (sequenciação)
<i>Rv1358</i>	1527762 - 1527781 1529081 - 1529062	5' tgggtgcctgccggagtta 3' 5' tctcgccaggcaggcaaac 3'	74	1300	(Santos, <i>et al.</i> , 2015) <sup>47</sup> (sequenciação)

<i>Rv1358</i>	1525886 - 1525905 1526963 - 1526982	5' atcg-aagctt- caccgagttaggcgggattt 3'  5' atcg-actagt- ttatcgctcggttgacg 3'	69 66	1096	Este trabalho (Clonagem pYUB854)
<i>Rv1358</i>	1522918 - 1522937 1523891 - 1523910	5' atcg-ggtacc- cgaagtcgtcttgacccgaa 3'  5' atcg-tctaga- cgtcggtcagccaggtattt 3'	66 67	992	Este trabalho (Clonagem pYUB854)

**Tabela A.7.3 – Informações relativas às condições reacionais de PCR utilizadas no presente trabalho**

Região Alvo/ Objetivo	Condições reacionais	Condições PCR
Análise de polimorfismos do gene <i>Rv1358</i> (sequenciação)	- 12,5 µl de NZYTaQ 2x Green Master Mix - 0,5 µl de MgCl <sub>2</sub> - 0,75 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) - 1 µl de cada <i>primers</i> - 5 µl de DNA - 4,25 µl de H <sub>2</sub> O. - 5 µl de controlo positivo com DNA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv - 20 µl de controlo negativo contendo H <sub>2</sub> O livre de nucleases.	<b>Desnaturação inicial:</b> 95°C, 5 min  <b>39 ciclos de:</b> - desnaturação: 95°C, 1 min - hibridação: 55°C, 1 min - extensão: 72°C, 1 min  <b>Extensão final:</b> 72°C, 10 min
Otimização em PCR convencional (Expressão genética <i>Rv1358</i> , <i>sigF</i> e <i>rRNA</i> 16S)	- 10 µl de NZYTaQ 2x Green Master Mix, - 0,4 µl ou 0,8 µl de MgCl <sub>2</sub> - 1 µl de cada <i>primer</i> - 1 µl de DNA - 6,6 µl ou 6,2 µl de H <sub>2</sub> O. - 20 µl de controlo negativo	<b>Desnaturação inicial:</b> 95°C, 120 s  <b>34 ciclos de:</b> - desnaturação: 95°C, 30 s - hibridação: 55°C, 30 s - extensão: 72°C durante, 30 s  <b>Extensão final:</b> 72°C, 10 min
Otimização da reação de PCR em tempo real (Expressão genética <i>Rv1358</i> , <i>sigF</i> e <i>rRNA</i> 16S)	- 10 µl de tampão de reação EvaGreen® Master Mix - 0,6 µl de cada <i>primer</i> - 1 µl de DNA - 7,8 µl de H <sub>2</sub> O. - 20 µl controlo negativo	<b>Desnaturação inicial:</b> 95°C, 120 s  <b>49 ciclos:</b> - hibridação e extensão: 60°C, 30 s (com leitura da fluorescência no final de cada ciclo) - desnaturação com intervalo de T <sup>º</sup> entre 65º e 95°C, com incremento de 0,5°C a cada 5 s (com leitura da fluorescência)
RT-qPCR (Expressão genética <i>Rv1358</i> , <i>sigF</i> e <i>rRNA</i> 16S)	- 5 µl de tampão de reação iTaQ Universal SYBR 2x - 0,125 µl de Transcriptase Reversa - 0,3 µl de cada <i>primer</i> , - RNA (o volume equivalente a uma concentração final de RNA de 20 ng/µl) - H <sub>2</sub> O - controlo sem a adição de RNA - controlo sem a adição de transcriptase reversa.	<b>Reação transcriptase reversa:</b> 50°C, 30 min  <b>Ativação da polimerase e desnaturação do cDNA:</b> 95°C, 1 min  <b>49 ciclos de:</b> - desnaturação: 95°C, 10 s - hibridação e extensão : 60°C, 30 (com <i>leitura da fluorescência no final de cada ciclo</i> ) - desnaturação com intervalo de T <sup>º</sup> entre 65º e 95°C, com incremento de 0,5°C a cada 5 s com ( <i>leitura da fluorescência</i> ).
Amplificação da região a montante e jusante do gene <i>Rv1358</i> (construção do mutante de eliminação)	- 12,5 µl de Phusion® High-Fidelity Master Mix 2x - 0,75 µl de DMSO - 1 µl de cada <i>primer</i> - 8,2 µl de DNA ( <i>M. tuberculosis</i> H37Rv) - 1,55 µl de H <sub>2</sub> O - 25 µl controlo negativo	<b>Desnaturação inicial:</b> 98°C, 30 s  <b>29 ciclos de:</b> - desnaturação: 98°C, 10 s, - hibridação: 60°C, 30 s, - extensão: 72°C, 30 s.  <b>Extensão final:</b> 72°C 10 min.

**Tabela A7.4 - Informação sobre as estirpes utilizadas nos ensaios de crescimento e na construção de mutantes.**

Estirpes	Genótipo/Spoligotipo	Referência/Fonte
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	Ept <sup>+</sup> , Kan <sup>s</sup>	Snapper <i>et al.</i> , 1990 <sup>90</sup>
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG Tokyo	SB0120	Doado por S.V. Gordon (UCD)

<i>Mycobacterium bovis</i> I,II, III e IV	SB0121	INIAV, isolados de campo obtidos de bovinos
<i>Escherichia coli</i> HB101	$\Delta$ (gpt-proA)62 leuB6 thi-1 lacY1 hsdSB20 recA rpsL20 (Str <sup>r</sup> ) ara-14 galK2 xyl-5 mtl-1 supE44 mcrBB	Boyer& Roulland-dussoix, 1969 <sup>91</sup>
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ (NZYStar)	endA1 hsdR17(rk, mk <sup>+</sup> ) supE44 thi -1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> ZAM15: Tn10(Tc <sup>r</sup> )]	Adquirida à Nzytech

**Tabela A7.5 – Informação sobre os plasmídeos utilizados neste trabalho.**

Plasmídeo	Caraterísticas	Referência/Fonte
pYUB854	Origem de replicação para <i>Escherichia coli</i> ( <i>oriE</i> ), um único local <i>k-cos</i> e local de corte <i>PacI</i> . Permite a introdução eficiente de um cosmídeo num micobacteriofago. Contém cassete de higromicina como marcador seletivo.	Bardarov,et al., 2002 <sup>65</sup>
phAE159	O fagemídeo phAE159 é derivado de phAE87. Contém uma eliminação de 5,6 kb que permite receber grandes insertos de DNA. Tem como marca de resistência o antibiótico ampicilina.	Bardarov,et al., 2002 <sup>65</sup>
Rv1358/ pYUB854	Gene Rv1358 clonado no vetor pYUB854.	Este trabalho
Rv1358/ pYUB854/ phAE159	Cosmídeo pYUB854/Rv1358 clonado no fagemídeo phAE159.	Este trabalho

**Tabela A7.6 - Composição e modo de preparação dos meios de cultura,tampões e soluções utilizados no presente trabalho.**

Meios de cultura e Reagentes	Composição/Litro
Middlebrook 7H9	Fornecedor: BDDifco™ Pesados 4,7g. Adicionados 10% (v/v) de ADS e 2 ml de glicerol ou 0,5% de piruvato de sódio, dependendo da espécie.Autoclavado
Middlebrook 7H10	Fornecedor: BDDifco™ Pesados 19g. Adicionados 10% (v/v) de ADS e 5 ml de glicerol ou 0,5% de piruvato de sódio, dependendo da espécie.Autoclavado.
Lowenstein Jensen piruvato	Fornecedor: Biogerm
Stonebrink	Fornecedor: Biogerm
LB	10 g Triptona; 5 g Extrato de levedura; 5 g Cloreto de sódio; 15 g de Agar. Autoclavado
SOC	0,5% (m/v) Extrato de levedura; 2% (m/v) Triptona; 10 mM Cloreto de sódio; 25 mM Cloreto de potássio; 10 mM Cloreto de magnésio; 20 mM Sulfato de magnésio; 20 mM Glucose. Filtrado com 0,22 $\mu$ m.
Top Agar	0,7% (m/v) Agar; 0,4% (m/v) Glicerol; 0,022% (m/v) Cloreto de cálcio. Autoclavado.
Colesterol a 1%	Preparar solução-stock de colesterol [20 mg/mL] em Tween 80 a 20%. Autoclavar e seguidamente ferver para dissolver completamente o colesterol. Efetuar diluição (de 1:20) em meio líquido Middlebrook 7H9 e ferver até dissolver.
NPS 1M	Pesados 2,97g de NPS e dissolvido em 10 ml meio líquido de Middlebrook 7H9. Filtrado com 0,22 $\mu$ m.
Suplemento ADS 10x	50g BSA (fração V da albumina sérica bovina); 20 g Glucose; 8,5g Cloreto de sódio. Filtrado com membrana de 0,22 $\mu$ m.
TBE 10X	108g Tris Base, 55g ácido bórico, 40 mL EDTA a 0,5M.
DEPC	Fornecedor: Sigma-Aldrich
Tampão MP	50 mM TrisÁcido Clorídrico; 150 mM Cloreto de sódio; 10 mM Cloreto de magnésio; 2 mM Cloreto de cálcio. Autoclavado.
Tampão SM	5,8g Cloreto de sódio; 2g Sulfato de magnésio; 50 Mm de 1M TrisÁcido Clorídrico; 5 ml de Agar 2% (m/v). Autoclavado.

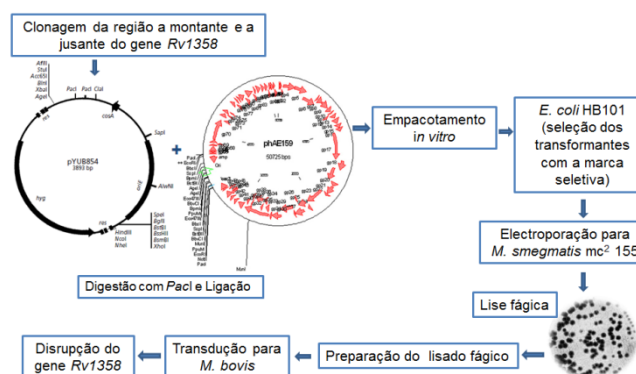
**Tabela A7.7 – Meios de cultura utilizados na preparação dos pré-inóculos para o crescimento em meio líquido.**

Estirpes	Meio de cultura líquido	Tempo de incubação
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	Middlebrook 7H9 suplementado com 2 ml de glicerol e 10% (v/v) de ADS	24h-48h
<i>M.bovis</i> BCG Tokyo	Middlebrook 7H9 suplementado com 0,5% piruvato de sódio e 10% (v/v) de ADS	2-3 semanas
<i>M. bovis</i> I,II, III e IV	Middlebrook 7H9 suplementado com 0,5% piruvato de sódio e 10% (v/v) de ADS	2-3 semanas
<i>E. coli</i> HB101	LB	24h
<i>E. coli</i> / pYUB854	LB suplementado com Higromicina a 50 mg/ml	24h-48h
<i>E. coli</i> / phAE 159	LB suplementado com Ampicilina a 100 mg/ml	24h-48h

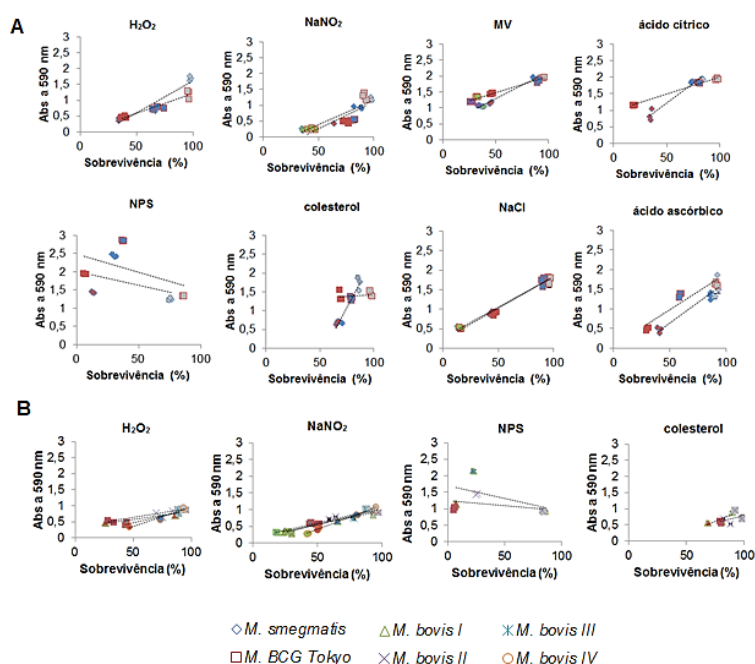
**Tabela A.7.8 – Resultados de *microarrays* descritos na literatura para *M. tuberculosis* crescido sob diferentes condições experimentais nas quais a expressão dos genes *Rv1358* e *sigF* se encontra aumentada ou diminuída.**

Condição experimental	Expressão <i>Rv1358</i>	Expressão <i>sigF</i>	Referências
0-200 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e 0-5 mM DETA/NO	Diminuída (1,5)	Diminuída (1,5)	Voskuil, <i>et al.</i> , 2011 <sup>75</sup>
0,2% O <sub>2</sub> (Hipoxia)	Diminuída (2)	Aumentada (4)	Rustad <i>et al.</i> , 2008 <sup>92</sup>
0-5 mM de DETA/NO	Diminuída (4)	Diminuída (2)	Honaker <i>et al.</i> , 2009 <sup>93</sup>
1 mg/ml de colesterol	Aumentada (7)	-	Nesbitt, <i>et al.</i> , 2010 <sup>85</sup>

DETA/NO – Dietilenotriamina/Óxido nítrico



**Fig. A.7.9– Esquema da estratégia de transdução especializada utilizada para a construção do mutante de eliminação para o gene *Rv1358*.**



**Fig.A.7.10– Comparação da quantidade de biofilme formado e da sobrevivência na presença de múltiplos stresses.A: Condições de stress estudadas em *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG Tokyo e B: Condições estudadas em *M. bovis* I, II, III e IV. A cada estirpe foi atribuído um símbolo (observável na figura) e a cada condição uma cor, nomeadamente: Cinzento – Controlo, Azul – 10 mM de ácido ascórbico, 5 mM de ácido cítrico, 0,9% de NaCl, 25 µM de MV, 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5 mM de NaNO<sub>2</sub>, 25 mM de NPS e 7H9 com Tween80; Vermelho – 15 mM de ácido ascórbico, 10 mM de ácido cítrico, 1,5% de NaCl, 50 µM de MV, 9 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 mM de NaNO<sub>2</sub>, 100 mM de NPS e 1 mg/ml de colesterol; Verde – 3% de NaCl; 100 µM de MV, 25 mM de NaNO<sub>2</sub>; Roxo – 150 µM de MV. Relativamente ao valor do R<sup>2</sup>, cada cor corresponde a uma estirpe, nomeadamente: Azul – *M. smegmatis*; Vermelho - *M. bovis* BCG Tokyo; Verde – *M. bovis* I; Roxo – *M. bovis* II; Azul claro – *M. bovis* III e Laranja – *M. bovis* IV.**